

The present invention relates to a stable recombinant cell clone, which is stable in serum-free and protein-free medium in the absence of a selection pressure for at least 40 generations, a biomass obtained by propagating the stable cell clone under serum-free and protein-free cultivation conditions and a method for producing recombinant proteins by means of the biomass. The invention also relates to a method for obtaining stable recombinant cell clones. Furthermore, the invention relates to the production of a recombinant protein in a serum-free and protein-free synthetic minimal medium.

The production of recombinant proteins, in particular biomedical products, such as blood factors, is becoming more and more important. In order to make optimal growth of recombinant cells possible, serum is generally added to the medium. Because of the high costs of serum and in order to avoid possible contaminations by viral or molecular pathogens owing to the serum in the cultivation medium, a series of serum-free media was developed which, in particular, was to contain no additives of bovine or human origin. The use of such media in the production process, apart from a low contamination risk to the products produced through viral and molecular pathogens, also allows simpler purification of the proteins expressed.

Recombinant cells are generally cultured in serum-containing medium to a high cell density, for example for a "working cell bank", and then adapted during the production phase to serum-free medium.

Miyaji et al. (1990, Cytotechnology 3:133-140) selected serum-independent cell clones in serum-free medium, which contained insulin and transferrin. It was found, however, that after 16 days, the living cell number and the expression rate constantly decreased. Miyaji et al. (1990, Cytotechnology 4:173-180) tried to improve the expression rate and the productivity of the recombinant cells by means of co-amplification with a marker gene.

Yamauchi et al. (1992, Biosci. Biotechnol. Biochem. 56:600-604) established serum-independent recombinant CHO subclones by the cultivation of serum-dependent cells on micro-titre plates as a monolayer for 3 to 4 weeks in serum-free medium which contained human serum albumin, insulin and transferrin. About 0.1% of the cells were serum-independent. Some of the subclones also grew in suspension culture in serum-free medium, and the cells aggregated and formed lumps. The duplicating time of the cells was 1.5 days. However, no details are given about the stability of the serum-independent clones obtained nor about the long-term cultivation of these clones in serum-free conditions.

Media, which allow the maintenance of the metabolic activity and growth of cells during the serum-free phase, often contain additional substances such as growth factors, such as insulin or transferrin, or adherence factors, which replace the serum components.

In order to avoid the addition of polypeptide factors, such as insulin or transferrin and to allow protein-free cultivation conditions, various techniques have been developed. Thus specially defined, complete protein-free

media have been developed which allow cell growth even under protein-free conditions.

WO 97/05240 describes the production of recombinant proteins under protein-free conditions, in which the cells co-express a growth factor, apart from the desired protein.

JP 2696001 describes the use of protein-free medium for the production of factor VIII in CHO cells with the addition of a non-ionic surface agent or cyclodextrin to increase the productivity of the host cells. In order to increase the effectiveness of these additives, it is recommended that butyrate and lithium be added, for example.

WO 96/26266 describes the cultivation of cells in a medium which contains a protein hydrolysate containing glutamine, the content of free amino acids of which is less than 15% of the total protein weight and the peptides of which have a molecular weight of less than 44 kD. As the cultivation medium for the cell cultures, synthetic minimal medium is used as the base medium, to which are also added, apart from protein hydrolysate, *inter alia*, foetal calf serum, gentamicin and mercaptoethanol. The use of this serum-containing medium for the recombinant production of blood factors is not mentioned.

US 5,393,668 describes special synthetic surfaces, which allow growth of adherent cells in protein-free conditions.

In order to stimulate cell proliferation, CHO cells, which over-express human insulin, were propagated on an artificial substrate, to which covalent insulin is bound (Ito *et al.*, 1996, PNAS USA 93:3598-3601).

Reiter et al. (1992, Cytotechnology 9:247-253) describe the immobilisation of r-CHO cells grown in serum-containing medium with a high density on carriers and subsequent perfusion of the immobilised cells in protein-free medium during the production phase, wherein a continuous release of protein into the cell culture supernatant was established. The cells were, however, perfused, in this case, for less than 10 generations in protein-free medium.

Previous methods for successfully producing a large-scale cell culture under protein-free conditions are described for continuous cell lines, in particular VERO cells (WO 96/15231). The cells are cultivated here under serum-free and protein-free conditions from the original ampoule to the large scale of 1200 l. However, these cells are not recombinant cells, but host cells, which are used for the production of virus antigens in a lytic process.

In contrast to adherent VERO cells, CHO cells, for example, are only adhesion-dependent to a limited extent. CHO cells cultivated by means of conventional methods under serum-containing conditions can bind both to smooth and also to porous microcarriers (US 4,978,616, Reiter et al., 1992, Cytotechnology 9:247-253). If CHO cells are cultivated under serum-free conditions, they lose this property and do not adhere to smooth carriers, such as Cytodex 3 or easily detach therefrom, if adhesion-promoting additives, such as, for example fibronectin, insulin or transferrin are not added to the medium. Owing to the low adherence of CHO cells to carriers under serum-free conditions, recombinant proteins are therefore generally produced in a suspension culture. The production process can proceed, in this case,

in a continuous or batch-wise method. The recombinant cell culture is cultivated, in this case, to an optimum cell density in the bioreactor, the protein expression is optionally induced and, for harvesting, the medium containing the expressed proteins, but also recombinant cells, is removed at certain intervals from the reaction tank and therefore from the production process. Owing to the constant loss of biomass, production efficiency in the bioreactor drops and only increases again slowly after the addition of fresh medium, as the cells have to grow to the desired cell density. There is therefore repeatedly, despite the continuous process, a delay phase, in which the production rate drops in this system. In addition, the growth and production capacity is limited by the maximum achievable cell density in a system of this type.

In the adaptation of cells cultivated under serum-containing conditions to protein-free medium, it was established again and again that the yield of expressed protein and the productivity of recombinant CHO cells after adaptation drops sharply in protein-free medium in comparison to serum-containing conditions (Paterson et al., 1994, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40:691-658).

This is to be attributed to an instability or reduced growth of the recombinant clones owing to the changed culture conditions. Owing to the changed fermentation conditions - despite the use of a stable original clone - a large part of the cells will repeatedly become cells with reduced expression or else non-producers, which overgrow product-producers during the production process, so the fermenter culture ultimately largely consists of non-producers or such cells having low expression.

This results in the fact that the maximum production capacity of the fermentation culture continuously drops and maximum product production is restricted to a certain number of generations or cell passages.

Various methods are described in the prior art which deal with the cultivation of cells in serum-free or serum and protein-free medium in the absence of a selection pressure (Zang et al., *Biotechnology*, Vol. 13, 1 April 1995, pages 389-392; WO 96/18734 A; Fischer et al., *Thromb. Thrombolysis*, 1996, 3(1), 57-62; Fischer et al., *FEBS letters*, Vol. 351, 1994, pages 345-348; Kaufman et al., *Molecular and Cellular Biology*, Vol. 9, No. 3, 1989, pages 1233-1242).

There is therefore a need for a system, in which continuous production, in particular in large-scale production of recombinant proteins under serum-free and protein-free conditions is possible over as long a time period as possible.

It would also be desirable to obtain a recombinant cell clone which is stable for many generations in the production phase under protein-free conditions and expresses recombinant protein.

The object of the present invention is therefore to provide an efficient method for the production of recombinant proteins under serum-free and protein-free cultivation and production conditions.

A further object is to provide a stable recombinant cell clone.

The object is achieved according to the invention by the embodiments characterised in the accompanying claims.

The cell clone according to the invention therefore forms a population of cells which can be cultivated in a stable manner in serum-free and protein-free medium in the absence of a selection pressure, for at least 40 generations. Preferably, more than 80%, in particular more than 99% of the cells of the cell population according to the invention or of the cell clone according to the invention are stable, in this case, for at least 40 generations.

The cultivation of the cells takes place, in this case, without selection, for example, without selection with respect to the selection marker and/or amplification gene, for example in the absence of MTX in the case of CHO-dhfr⁻ cells.

In the scope of this invention, an original cell clone is taken to mean a recombinant cell clone transfectant, which after transfection of host cells with a recombinant nucleotide sequence under laboratory conditions expresses recombinant product in a stable manner. The original clone is cultivated to optimise the growth in serum-containing medium. To increase the productivity, the original clone is optionally cultivated in the presence of a selection means and selection with respect to the selection marker and/or amplification marker. For large-scale production, the original cell clone is cultivated under serum-containing cultivation conditions to a high cell density and, shortly

before the production phase, adapted to serum-free and/or protein-free medium. The cultivation takes place, in this case, without selection pressure.

It has been found that under these conditions, a large part of more than 95% of the cells in a cell culture of this type adapted to serum-free and protein-free medium become non-product-producers. It was possible to show by means of immune fluorescence with product-specific antibodies, that depending on the generation time of the cells in serum-free and protein-free medium, the number of non-producers in a culture increases and overgrows the product-producers, so the production capacity of the culture drops.

The cell culture obtained after adaptation to serum-free and protein-free medium is tested on those cells clones of the cell population which produce stable products under serum-free and protein-free conditions, in the absence of a selection pressure. This may take place, for example, by immune fluorescence with marked, specific antibodies directed against the recombinant polypeptide or protein. The cells identified as product-producers are isolated from the cell culture and propagated again under serum-free and protein-free conditions, preferably under production-equivalent conditions. The cells can be isolated, in this case, by isolating the cells and testing on product-producers. The cell culture containing the stable cells is optionally tested again on stable recombinant clones and these are isolated from the cell culture and cloned. The stable recombinant cell clones obtained under serum-free and protein-free conditions are then propagated further under serum-free and protein-free conditions.

The recombinant cell clone according to the invention is distinguished in particular in that it is stable in serum-free and protein-free medium in the absence of a selection pressure for at least 40, preferably at least 50, in particular more than 60, generations and expresses recombinant product. In this case, they demonstrate the stability without having to be assisted by aids, such as matrices or solid surfaces, for example as carriers. Cultivation in high cell densities is not necessary either according to the invention.

According to a particular aspect of the invention, the stable recombinant cell clone is present in isolated form. Starting from the stable cell clone, a cell culture is obtained by propagating the stable cells under serum-free and protein-free conditions.

The stable, recombinant cell clone according to the invention is preferably derived from a recombinant mammal cell. Recombinant mammal cells may be all cells, in this case, which contain coding sequences for a recombinant polypeptide or protein. This includes all continuously growing cells, which grow both adherently and non-adherently. Recombinant CHO cells or BHK cells are particularly preferred. Recombinant polypeptides or proteins may be blood factors, growth factors or other biomedically relevant products.

According to the present invention, stable recombinant cell clones are preferred which contain the coding sequence for a recombinant blood factor such as Factor II, Factor V, Factor VII, Factor VIII, Factor IX, Factor X, Factor XI, Protein S, Protein C, an activated form of one of these

factors or vWF, and are in a position to express this stably over a plurality of generations. Particularly preferred in this case, are recombinant CHO cells, which express vWF or a polypeptide with vWF activity, Factor VIII or a polypeptide with VIII activity, vWF and Factor VIII, Factor IX or Factor II.

The cell clone selected according to the invention under serum-free and protein-free conditions is distinguished, in particular, in that it is stable for at least 40, preferably for at least 50 generations, particularly preferably for more than 60 generations, in serum-free and protein-free medium, in the absence of a selection pressure.

In order to create a master cell bank, 30 generations are required. In order to carry out an average batch culture with a 1000 litre scale, at least 40 generations are required. Thus it is possible for the first time, proceeding from a single clone, to produce a "master cell bank" (MCB), a "working cell bank" (WCB) with about 8 to 10 generations and therefore a cell culture with a production scale (production biomass) with up to 20 to 25 generations under these conditions, as previous cell clones became unstable a few generations after growth on serum- or protein-free medium, so a) no consistent cell culture with product-producers and b) no stable product productivity was possible over a relatively long period of time.

The cell clone according to the invention is therefore stable under production conditions in serum-free and protein-free medium in the absence of a selection pressure for at least 40 generations. Previously described methods

merely demonstrated a generation number of less than 10 generations of product productivity under protein-free conditions (Reiter et al., 1992, supra).

A minimum number of at least 40 generations, preferably more than 50, particularly preferably more than 60 generations in the production process, during which a stable expression of proteins takes place and the cells do not change morphologically-phenotypically and have no tumorigenic properties, is considered to be a stability criterion.

It has surprisingly been found that the cell clone according to the invention, under serum-free and protein-free conditions, has an increased product productivity even in comparison to the original cell clone, which was cultivated in serum-containing medium.

According to a further aspect, the present invention provides a cell culture, which contains at least 90%, preferably more than 95%, particularly preferably more than 98%, stable recombinant cells, which, under serum-free and protein-free conditions, are stable for at least 40 generations, in particular for at least 50 generations, and express recombinant product.

A "cell culture" in the scope of the present invention is taken to mean a master cell bank (MCB), a working cell bank (WCB) or a production biomass in a large-scale production bioreactor.

According to the invention, the cell culture is obtained, in particular by cultivation of a stable recombinant cell

clone of the type described above under serum-free and protein-free conditions in the absence of a selection pressure.

The cell culture according to the invention can be obtained, in this case, by propagating the isolated stable cell clone from the individual clone, the seed cells up to the MCB, the WCB or a biomass in production scale in the bioreactor under serum-free and protein-free conditions, for example without selection pressure on the selection and/or marker gene. It has been shown, in particular, that the recombinant cells in a cell culture, which are obtained proceeding from the stable recombinant clone according to the invention, are stable for at least 40 generations under serum-free and protein-free conditions in the absence of a selection pressure.

The cell culture provided according to the present invention, which is produced from a serum-independent and protein-independent stable cell clone, has, under protein-free cultivation and production conditions, at least 90%, preferably at least 95%, particularly preferably at least 98%, stable recombinant cells. "Stable recombinant cells" are in this case taken to mean, in particular recombinant mammal cells, which are derived from the stable cell clone. Preferred, in this case, are recombinant CHO cells, preferably CHO-dhfr⁻ cells, CHO-K1 cells and BHK cells, which express a blood factor, preferably recombinant vWF, Factor VIII, Factor VIII and vWF, Factor IX or Factor II.

The cell culture according to the invention may contain the stable recombinant cells as a suspension culture. The cells may also be immobilised on a carrier, in particular a

microcarrier, porous microcarriers being preferred in particular. Porous carriers, such as, for example, Cytoline® or Cytopore® have proved particularly suitable.

According to a further aspect, the present invention provides a method for large-scale production of a recombinant product under serum-free and protein-free conditions, using the stable cell clone according to the invention. The method, in this case, comprises the steps of providing an isolated, stable recombinant cell clone of the type described above for producing a cell culture. In this case, the propagation of the isolated stable cell clone takes place under serum-free and protein-free conditions in the absence of a selection pressure from the stable single cell clone to the cell culture. In particular, the sub-cultivation of the stable cell clones takes place under protein-free conditions, in particular without the addition of a protease, such as trypsin, for example. This ensures that contamination, optionally caused by the addition of serum-containing or protein-containing additives of human or animal origin to the cell culture does not occur at any time during the production of a cell culture used in the production of a recombinant product. Thus a method is described for the first time which allows [lacuna] from the starting clone via the production of a working cell bank up to the production biomass and the subsequent production of recombinant protein under serum-free and protein-free conditions in the absence of a selection pressure.

The production of the recombinant products with the cell culture according to the invention, which contains more than 90%, preferably more than 95%, particularly preferably more than 98%, stable product-producer cells, can take

place as a suspension culture or with cells immobilised on carriers. The process can take place here by a batch-wise continuous method or by a perfusion technique with serum-free and protein-free medium.

The expressed recombinant proteins are then obtained from the cell culture supernatant, purified with methods known from the prior art and further processed.

Any known synthetic medium can be used as the serum-free and protein-free medium. Conventional synthetic minimal media may contain inorganic salts, amino acids, vitamins and a carbohydrate source and water. For example, it may be DMEM/HAM's F12 medium. The content of soya or yeast extract may be between 0.1 and 100 g/l, particularly preferably between 1 and 5 g/l. Soya extract, for example soya peptone can be used as a particularly preferred embodiment. The molecular weight of the soya peptone is less than 50 kD, preferably less than 10 kD.

A medium with the following composition is used particularly preferably: synthetic minimal medium (1 to 25 g/l), soya peptone (0.5 to 50 g/l), L-glutamine (0.05 to 1 g/l), NaHCO_3 (0.1 to 10 g/l), ascorbic acid (0.0005 to 0.05 g/l), ethanolamine (0.0005 to 0.05 g/l), Na-selenite (0.0001 to 0.01 g/l). A non-ionic surface agent such as, for example, polypropylene glycol (PLURONIC F-61, PLURONIC F-68, SYNPERONIC F-68, PLURONIC F-71 or PLURONIC F108) can be optionally added to the medium, as a defoaming agent.

This agent is generally used in order to protect the cells from the negative effects of ventilation, as without the addition of a surface agent, the rising and bursting air

bubbles can lead to damage of the cells which are located on the surface of these air bubbles ("sparging"), (Murhammer und Gooches, 1990, Biotechnol. Prog. 6:142-148).

The quantity of non-ionic surface agent may be between 0.05 and 10 g/l in this case, however a small a quantity as possible between 0.1 and 5 g/l is particularly preferred. Moreover, the medium may also contain cyclodextrin or a derivative thereof.

The addition of non-ionic surface agent or cyclodextrin is not essential to the invention, however. The serum-free and protein-free medium preferably contains a protease inhibitor, such as, for example, serine protease inhibitors, which are suitable for tissue culture and are of synthetic or plant origin.

The parameters for the cultivation of the cells, such as O₂ concentration, perfusion speed or medium change, pH, temperature and cultivation technique are dependent, in this case, on the cell types used in each case and can easily be determined by the person skilled in the art. For example, cultivation of CHO cells may take place in a stirring tank and perfusion with protein-free medium at a perfusion rate of 1 to 10 volume changes/day, a pH between 7.0 and 7.8, preferably 7.4, an O₂ concentration between 40% and 60%, preferably 50%, and a temperature between 34°C and 38°C, preferably 37°C.

According to a further aspect, the present invention provides a method for obtaining a stable recombinant cell clone, comprising the steps of

- propagating a recombinant original clone up to the cell culture in serum-containing medium, without selection pressure
- cultivating the cells under serum-free and protein-free, preferably under production-equivalent conditions in the absence of a selection pressure
- testing the cell culture under serum-free and protein-free conditions for product-producers
- cloning the stable recombinant cell clones under serum-free and protein-free conditions, wherein the cloning can take place by means of generally known techniques, such as isolation of the cells by thinning out and cultivating the individual clones
- propagating the isolated cell clones under serum-free and protein-free conditions in the absence of a selection pressure and
- optionally testing out the cell culture for product-producers.

Only such recombinant cell clones are regarded as stable, in this case, which clones stably express recombinant protein for at least 10, preferably at least 20, and in particular at least 50 generations, in protein-free medium.

The invention will be described with the aid of the following examples, although it is not restricted to the examples.

Short description of the figures

Fig. 1: shows the micrograph of a working cell bank of an original clone at the time of adaptation of serum-containing medium to serum-free and protein-free medium

(A), after 10 generations in serum-free and protein-free medium (B) and after 60 generations in serum-free and protein-free medium (C).

Fig. 2: shows the micrograph of a cell culture starting from a stable recombinant cell clone under serum-free and protein-free conditions at the stage of the working cell bank (A), after 10 generations (B) and after 60 generations (C).

Fig. 3: shows the results of the cultivation of a rFVIII-CHO cell clone in a 10 l perfusion bioreactor.

- a) FVIII activity (munits/ml) and perfusion rate (1-5/day) over a time period of 42 days.
- b) Volumetric productivity (units factor VIII/1/day) in the perfusion bioreactor.

Examples:

Example 1: Stability of rvWF-CHO cells after conversion from serum-containing medium to serum-free and protein-free medium

Plasmid phAct-rvWF and pSV-dhfr were co-transfected to CHO-dhfr⁻ cells and vWF-expressing clones, as described in Fischer et al. (1994, FEBS Letters 351:345-348), subcloned. From the subclones, which stably expressed rvWF, under serum-containing conditions, but in the absence of MTX, a working cell bank (WCB) was created and the cells immobilised under serum-containing conditions on a porous microcarrier (Cytopore®). Once a cell density of 2×10^7 cells/ml carrier matrix was reached, the conversion of the cells to serum-free and protein-free medium took place. The

cells were cultivated further for several generations under serum-free and protein-free conditions. By means of immune fluorescence with marked anti-vWF antibodies, the cells were tested at various times in serum-free and protein-free medium. The stability of the cells was evaluated in the working cell bank before the medium conversion, after 10 and 60 generations in the serum-free and protein-free medium. While the working cell bank still had 100% rvWF producers (Fig. 1A), the proportion of the rvWF producers dropped after 10 generations in serum-free and protein-free medium to about 50% (Fig. 1B). After 60 generations, more than 95% of the cells were identified as non-producers (Fig. 1C).

Example 2: Cloning stable recombinant CHO clones

Of the cell culture containing rvWF-CHO cells according to Example 1, which had been cultivated for 60 generations in serum-free and protein-free medium (Fig. 1C) a thinning was started and in each case 0.1 cells/well sown to a microtiter plate. The cells were cultivated in DMEM/HAM's F12 without serum or protein additions and without a selection pressure for about 3 weeks and the cells tested by immune fluorescence with marked anti-vWF antibodies. A cell clone identified as positive was used as a starting clone for the production of a seed cell bank. A master cell bank (MCB) in serum-free and protein-free medium was created from the seed cell bank and individual ampoules frozen off for further production of a working cell bank. Starting from a single ampoule, a working cell bank was produced in serum-free and protein-free medium. The cells were immobilised on porous microcarriers and further cultivated for several generations under serum-free and

protein-free conditions. By means of immune fluorescence with marked anti-vWF antibodies, the cells were tested at various times in serum-free and protein-free medium for productivity. The stability of the cells was evaluated at the stage of the working cell bank and after 10 and 60 generations in serum-free and protein-free medium. Both at the stage of the working cell bank (Fig. 2A) and after 10 (Fig. 2B) and 60 generations (Fig. 2C), approaching 100% of the cells were identified as positive stable recombinant clones, which express rvWF.

Example 3: Cell-specific productivity of the recombinant cell clone

A defined cell number was removed from the defined stage during the cultivation of recombinant cells and incubated with fresh medium for 24 h. The rvWF:Risto-CoF activity was determined in the cell culture supernatants. Table 1 shows that the cell-specific productivity in the stable recombinant cell clones according to the invention was stable even after 60 generations in serum-free and protein-free medium, and was even increased in comparison to the original clone, which was cultivated in serum-containing medium.

Table 1:

Cell clone	Cell-specific productivity of the working cells mU rvWF/10 ⁶ cells/day	Cell-specific productivity after 10 generations mU rvWF/10 ⁶ cells/day	Cell-specific productivity after 60 generations mU rvWF/10 ⁶ cells/day
rvWF-CHO #808.68 original cell clone	55	30	< 10
r-vWF-CHO F7) of stable clones	62	65	60

*) filed according to the Budapest Treaty on 22.01.1998 (ECACC (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, Wiltshire SP4 0JG, UK); filing number 98012206)

Example 4: Cultivation of rFVIII-CHO cells in protein- and serum-free minimal medium

A cell culture containing rFVIII-CHO cells was cultivated in a 10 l stirring tank by perfusion. In this case, a serum-free and protein-free medium was used. The cells were immobilised, in this case, on a porous microcarrier (Cytopore®, Pharmacia) and cultivated for at least 6 weeks. The perfusion rate was 4 volume changes/day, the pH was 6.9 to 7.2, the O₂ concentration about 20 to 50% and the temperature 37°C.

Fig. 3 shows the results of the cultivation of a rFVIII-CHO cell clone in a 10 l perfusion bioreactor.

a) FVIII activity (munits/ml) and perfusion rate (l-5/day) over a period of 42 days.

b) Volumetric productivity (units factor VIII/l/day) in the perfusion bioreactor.

Table 2:

Cultivation days	Cell-specific productivity (mU/10 ⁶ cells/day)	Immunofluorescence (% FVIII-positive cells)
15	702	n.a.
21	1125	- n.a.
28	951	> 95%
35	691	> 95%
42	970	n.a.

Table 2 shows the stability and specific productivity of the rFVIII-expressing cells. Samples were taken for these results after 15, 21, 28, 35 and 42 days, centrifuged off at 300 g and resuspended in fresh serum-free and protein-free medium. After a further 24 hours, the Factor VIII concentration in the cell culture supernatants and the cell number were determined. Starting from this data, the specific FVIII-productivity was calculated.

A stable average productivity of 888 munits/10⁶-cells/day was achieved. This stable productivity was also confirmed by immune fluorescence with marked anti-FVIII antibodies after 15, 21, 28, 35 and 52 days in serum-free and protein-free medium.

Captions**Fig. 3**

Perfusionsprozess = perfusion process

Arbeitsvolumen = working volume

Aktivität = activity

Perfusionsrate = perfusion rate

Zeit = time

Tage = days

Translator's Note

There appears to be an omission on P. 11 towards the end of the first paragraph (third paragraph on P. 10 of translation).

Claims

- 5 1. Method for producing a stable recombinant cell clone, which is stable under production conditions in serum- and protein-free medium for at least 40 generations, characterised by the following steps:
- providing a recombinant original cell clone,
 - cultivating the recombinant original cell clone on serum-containing
10 medium,
 - adapting the cells to serum- and protein-free medium in the absence of a selection pressure,
 - testing the cell culture after adaptation for stable product-producers in the absence of a selection pressure and
 - 15 - cloning a stable product-producer-cell clone in serum- and protein-free conditions in the absence of a selection pressure.
2. Method according to claim 1, characterised in that, after cloning, the stable cell clone obtained is present in isolated form.
- 20 3. Method according to claim 1 or 2, characterised in that a recombinant mammal cell is provided as the original clone.
4. Method according to claim 3, characterised in that the mammal cell is a
25 recombinant CHO cell or BHK cell.
5. Method according to any one of claims 1 to 4, characterised in that the recombinant cell clone contains the coding sequences for a recombinant polypeptide or protein.
- 30 6. Method according to claim 5, characterised in that the recombinant protein is a blood factor, selected from the group consisting of Factor II, Factor

V, Factor VII, Factor VIII, Factor IX, Factor X, Factor XI, Protein S, Protein C or an activated form of one of the factors, or vWF.

7. Method according to any one of claims 1 to 6, characterised in that a
5 recombinant CHO cell, which expresses von Willebrand factor, is provided as the original clone.
8. Method according to any one of claims 1 to 6, characterised in that a
10 recombinant CHO cell, which expresses Factor VIII, is provided as the original clone.
9. Method according to any one of claims 1 to 6, characterised in that a
15 recombinant CHO cell, which co-expresses Factor VIII and vWF, is provided as the original clone.
10. Method according to any one of claims 1 to 6, characterised in that a
recombinant CHO cell, which expresses Factor IX, is provided as the original clone.
- 20 11. Method according to any one of claims 1 to 6, characterised in that a recombinant CHO cell, which expresses Factor II, is provided as the original clone.
- 25 12. Stable recombinant cell clone, obtainable by a method according to any one of claims 1 to 11, characterised in that under production conditions in serum- and protein-free medium, in the absence of a selection pressure, stable for at least 40 generations, it expresses a recombinant product.
- 30 13. Cell clone according to claim 12, characterised in that it is present in isolated form.

14. Cell clone according to either of claims 12 or 13, characterised in that it is derived from a recombinant mammal cell.
15. Cell clone according to claim 14, characterised in that the mammal cell is a recombinant CHO cell or BHK cell.
16. Cell clone according to claim 15, characterised in that the mammal cell is a recombinant CHO cell.
17. Cell clone according to any one of claims 12 to 16, characterised in that it contains the coding sequences for a recombinant polypeptide or protein.
18. Cell clone according to claim 17, characterised in that the recombinant protein is a blood factor, selected from the group consisting of Factor II, Factor V, Factor VII, Factor VIII, Factor IX, Factor X, Factor XI, Protein S, Protein C or an activated form of one of the factors, or vWF.
19. Cell clone according to claim 18, characterised in that the recombinant protein is Factor VIII.
20. Cell clone according to claim 16, characterised in that the cell is a recombinant CHO cell, which expresses von Willebrand factor.
21. Cell clone according to claim 16, characterised in that the cell is a recombinant CHO cell, which expresses Factor VIII.
22. Cell clone according to claim 16, characterised in that the cell is a recombinant CHO cell, which co-expresses Factor VIII and vWF.
23. Cell clone according to claim 16, characterised in that the cell is a recombinant CHO cell, which expresses Factor IX.

24. Cell clone according to claim 16, characterised in that the cell is a recombinant CHO cell, which expresses Factor II.
25. Cell culture, characterised in that it can be obtained by cultivating a stable recombinant cell clone according to claim 12.
26. Cell culture, characterised in that it contains at least 90% stable recombinant cell clones according to claim 12.
27. Cell culture according to claim 25 or 26, characterised in that the stable recombinant cell clones are mammal cells.
28. Cell culture according to claim 27, characterised in that the mammal cells are recombinant CHO cells.
29. Cell culture according to claim 28, characterised in that the CHO cells are CHO-DHFR cells or CHO-K1 cells.
30. Cell culture according to any one of claims 25 to 29, characterised in that the stable recombinant cells contain a coding sequence for a recombinant polypeptide or protein.
31. Cell culture according to any one of claims 25 to 30, characterised in that the stable recombinant cells are immobilised on a microsupport.
32. Method for industrial production of a recombinant product under serum- and protein-free conditions, characterised in that it comprises the following steps:
- providing an isolated, stable recombinant cell clone according to claim 12,

- propagating the stable cell clone in serum- and protein-free medium from the initial clone up to the cell culture in the absence of a selection pressure,
 - producing the cell culture containing stable cells in the bioreactor in the absence of a selection pressure, and
 - harvesting the proteins from the culture supernatant.
- 5
33. Method according to claim 32, characterised in that the serum- and protein-free medium is a synthetic minimal medium containing a yeast or soya extract.
- 10
34. Method according to claim 32 or 33, characterised in that the medium contains cyclodextrin or a derivative thereof.
- 15
35. Method according to any one of claims 32 to 34, characterised in that the serum- and protein-free medium contains a protease inhibitor.

WO 01/11021

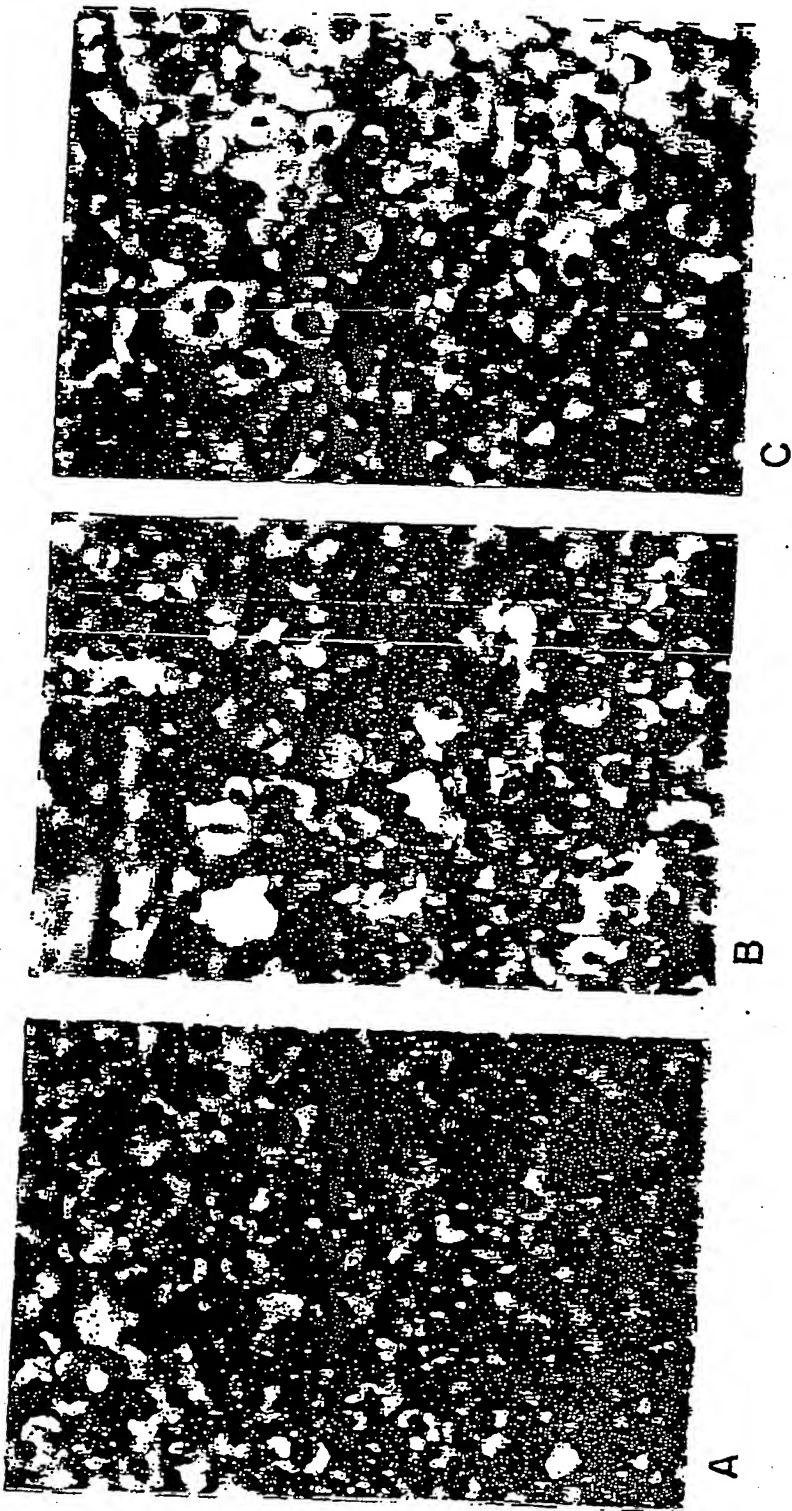
1/3

PCT/AT99/00197

Fig. 1



Fig. 2



WO 01/11021

3/3

PCT/AT99/00197

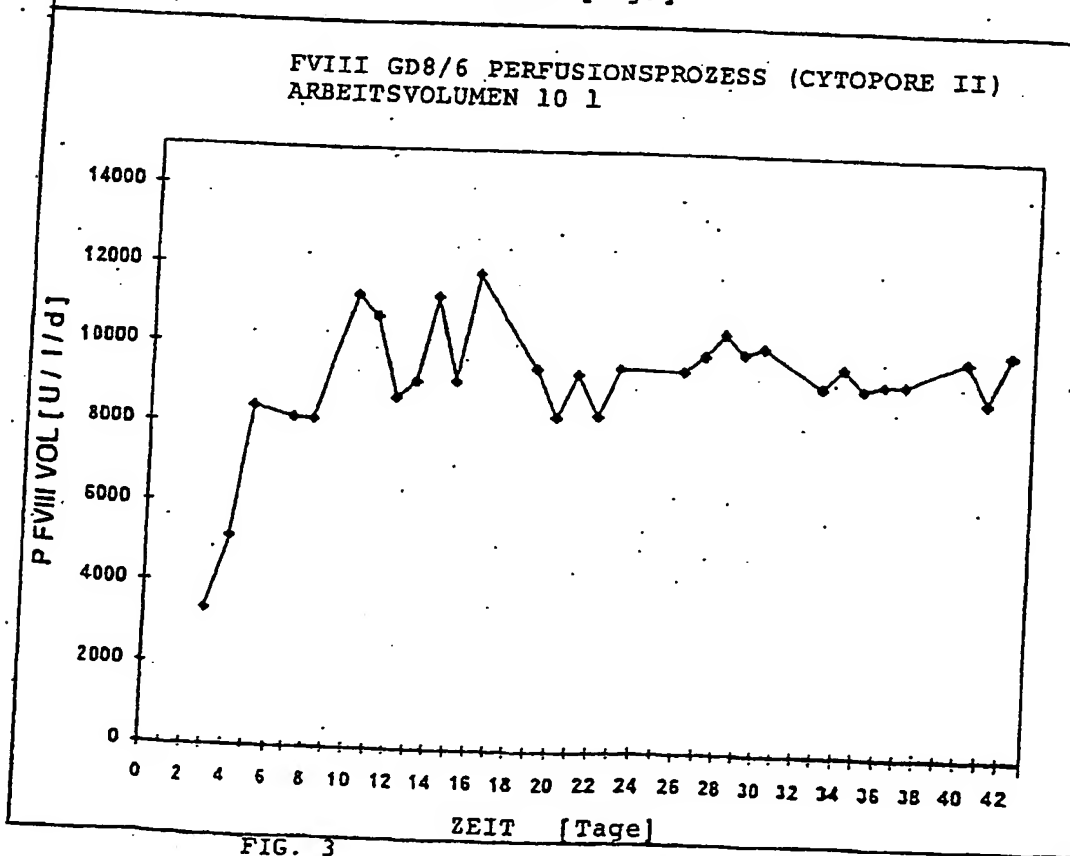
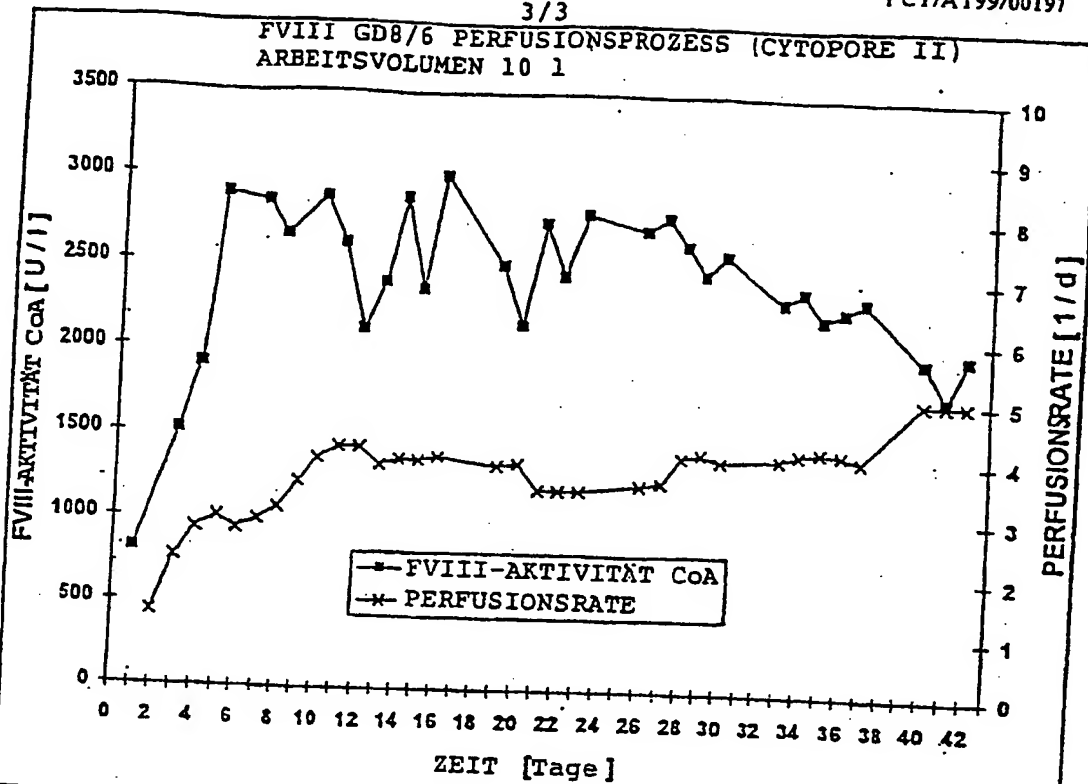


FIG. 3

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
15. Februar 2001 (15.02.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/11021 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 5/10, C12P 21/02, C12N 9/64, C07K 14/745
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/AT99/00197
- (22) Internationales Anmeldedatum:
5. August 1999 (05.08.1999)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): BAXTER AKTIENGESELLSCHAFT [AT/AT]; Industriestrasse 67, A-1221 Wien (AT).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): REITER, Manfred [AT/AT]; Gebrüder-Lang-Gasse 11/17, A-1150 Wien (AT). MUNDT, Wolfgang [AT/AT]; Florianigasse 57/11/2/6, A-1080 Vienna (AT). DORNER, Friedrich [AT/AT]; Peterlinigasse 17, A-1230 Wien (AT).
- (74) Anwälte: SONN, Helmut usw.; Riemergasse 14, A-1010 Wien (AT).
- (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Veröffentlicht:
— Mit internationalem Recherchenbericht.
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.



(54) Title: RECOMBINANT STABLE CELL CLONE, ITS PRODUCTION AND USE THEREOF

(54) Bezeichnung: REKOMBINANTER STABILER ZELLKLON, SEINE HERSTELLUNG UND VERWENDUNG

(57) Abstract: The invention relates to a stabile recombinant cell clone which is stabile in a medium containing no serum and proteins for at least 40 generations, and to a biomass which is obtained by multiplying the stabile cell clone under cultivation conditions that do not involve the use of serum or proteins. The invention also relates to a method for producing recombinant proteins using the biomass, to a method for producing stabile recombinant cell clones, and to the production of a recombinant protein in a synthetic minimal medium that does contain serum or proteins.

(57) Zusammenfassung: Beschrieben wird ein stabiler rekombinanter Zellklon, der im serum- und proteinfreien Medium für mindestens 40 Generationen stabil ist, eine Biomasse erhalten durch Vermehrung des stabilen Zellklons unter serum- und proteinfreien Kultivierungsbedingungen und ein Verfahren zur Herstellung von rekombinanten Proteinen mittels der Biomasse. Desweiteren betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Gewinnung von stabilen rekombinanten Zellklonen. Weiters betrifft die Erfindung die Herstellung eines rekombinanten Proteins in einem serum- und proteinfreien synthetischen Minimalmedium.

WO 01/11021 A1

REKOMBINANTER STABILER ZELLKLON, SEINE HERSTELLUNG UND VERWENDUNG

Die vorliegende Erfindung betrifft einen stabilen rekombinanten Zellklon, der im serum- und protein-freien Medium für mindestens 40 Generationen stabil ist, eine Biomasse erhalten durch Vermehrung des stabilen Zellklons unter serum- und proteinfreien Kultivierungsbedingungen und ein Verfahren zur Herstellung von rekombinanten Proteinen mittels der Biomasse. Desweiteren betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Gewinnung von stabilen rekombinanten Zellklonen. Weiters betrifft die Erfindung die Herstellung eines rekombinanten Proteins in einem serum- und protein-freien synthetischen Minimalmedium.

Die Herstellung von rekombinanten Proteinen, insbesondere von biomedizinischen Produkten, wie Blutfaktoren, gewinnt immer mehr an Bedeutung. Um ein optimales Wachstum von rekombinanten Zellen zu ermöglichen, wird dem Medium zumeist Serum zugegeben. Aufgrund der hohen Kosten von Serum und um mögliche Verunreinigungen durch virale oder molekulare Pathogene durch das Serum im Kultivierungsmedium zu vermeiden, wurde eine Reihe von serum-freien Medien entwickelt, die insbesondere keine Zusätze bovinen oder humanen Ursprungs enthalten sollten. Die Verwendung solcher Medien beim Herstellungsprozeß erlaubt neben der geringen Kontaminationsgefahr der hergestellten Produkte durch virale und molekulare Pathogene auch eine einfachere Reinigung der exprimierten Proteine.

Rekombinante Zellen werden zumeist in serumhaltigem Medium bis zu einer hohen Zelldichte, etwa für eine "Working cell bank" angezogen, und anschließend während der Produktionsphase auf serumfreies Medium umadaptiert.

Miyaji et al. (1990, Cytotechnology 3:133-140) selektionierten serum-unabhängige Zellklone in serumfreiem Medium, das Insulin und Transferrin enthielt. Es zeigte sich jedoch, daß nach 16 Ta-

gen die Lebendzellzahl und die Expressionsrate ständig abnahm. Durch Coamplifikation mit einem Markergen versuchten Miyaji et al. (1990, Cytotechnology 4:173-180) die Expressionsrate und die Produktivität der rekombinanten Zellen zu verbessern.

Yamauchi et al. (1992, Biosci. Biotechnol. Biochem. 56:600-604) etablierten serum-unabhängige rekombinante CHO-Subklone durch Kultivierung serum-abhängiger Zellen auf Mikrotiterplatten als Monolayer für 3 bis 4 Wochen in serum-freiem Medium, das humanes Serumalbumin, Insulin und Transferrin enthielt. Etwa 0,1% der Zellen waren serum-unabhängig. Ein Teil der Subklone wuchs auch in Suspensionkultur in serumfreiem Medium, wobei die Zellen jedoch aggregierten und klumpten. Die Verdopplungszeit der Zellen betrug 1,5 Tage. Es werden jedoch weder Angaben über die Stabilität der erhaltenen serum-unabhängigen Klone noch über die Langzeitkultivierung dieser Klone unter serumfreien Bedingungen gemacht.

Medien, die die Aufrechterhaltung der metabolischen Aktivität und ein Wachstum von Zellen während der serumfreien Phase erlauben, enthalten oftmals zusätzlich Substanzen, wie Wachstumsfaktoren, wie Insulin oder Transferrin, oder Adhärenzfaktoren, die die Serumkomponenten ersetzen.

Um die Zugabe von Polypeptidfaktoren, wie Insulin oder Transferrin, zu vermeiden und proteinfreie Kultivierungsbedingungen zu erlauben, wurden verschiedene Techniken entwickelt. So wurden speziell definierte, komplette proteinfreie Medien entwickelt, die ein Zellwachstum auch unter proteinfreien Bedingungen erlauben.

WO 97/05240 beschreibt die Herstellung von rekombinanten Proteinen unter proteinfreien Bedingungen, wobei die Zellen neben dem gewünschten Protein einen Wachstumsfaktor coexprimieren.

JP 2696001 beschreibt die Verwendung von proteinfreiem Medium für die Herstellung von Faktor VIII in CHO-Zellen unter Zugabe eines nicht-ionischen Oberflächenmittels oder Cyclodextrin zur Steigerung der Produktivität der Wirtszellen. Um die Wirksamkeit

dieser Zusätze zu steigern, wird die Zugabe von beispielsweise Butyrat und Lithium empfohlen.

WO 96/26266 beschreibt die Kultivierung von Zellen in einem Medium, das ein Glutamin enthaltendes Proteinhydrolysat enthält, dessen Gehalt an freien Aminosäuren kleiner als 15% des Gesamtproteingewichts ist und dessen Peptide ein Molekulargewicht von kleiner 44kD aufweisen. Als Kultivierungsmedium für die Zellkulturen wird als Basismedium synthetisches Minimalmedium verwendet, dem neben Proteinhydrolysat auch unter anderem fötales Kälberserum, Gentamycin und Mercaptoethanol zugesetzt wird. Die Verwendung dieses serumhaltigen Mediums für die rekombinante Herstellung von Blutfaktoren wird nicht erwähnt.

US 5,393,668 beschreibt spezielle synthetische Oberflächen, die ein Wachstum von adhärennten Zellen unter proteinfreien Bedingungen erlauben.

Um die Zellproliferation zu stimulieren, wurden CHO-Zellen, die humanes Insulin überexprimieren, auf einem artifiziellen Substrat, an das kovalent Insulin gebunden ist, vermehrt (Ito et al., 1996, PNAS USA 93:3598-3601).

Reiter et al. (1992, Cytotechnology 9:247-253) beschreiben die Immobilisierung von in serumhaltigem Medium angezüchteten r-CHO-Zellen bei einer hohen Dichte auf Trägern und anschließender Perfusion der immobilisierten Zellen in proteinfreiem Medium während der Produktionsphase, wobei eine kontinuierliche Freisetzung von Protein in den Zellkulturüberstand festgestellt wurde. Die Zellen wurden dabei jedoch für weniger als 10 Generationen in proteinfreiem Medium perfundiert.

Bisherige Verfahren zur erfolgreichen Herstellung einer großtechnischen "large-scale"-Zellkultur unter proteinfreien Bedingungen werden für kontinuierliche Zelllinien, insbesondere VERO-Zellen, beschrieben (WO 96/15231). Die Zellen werden dabei unter serum- und proteinfreien Bedingungen von der Original-Ampulle bis zum großtechnischen Maßstab von 1200 l angezogen. Es handelt sich dabei jedoch nicht um rekombinante Zellen, sondern um

Wirtszellen, die für die Produktion von Virusantigenen in einem lytischen Prozeß eingesetzt werden.

Im Gegensatz zu adhärenenten VERO-Zellen sind beispielsweise CHO-Zellen nur bedingt haftungsabhängig. Mittels konventioneller Methoden unter serumhaltigen Bedingungen angezogene CHO-Zellen können sowohl an glatte als auch an poröse Mikroträger binden (US 4,978,616, Reiter et al., 1992, Cytotechnology 9:247-253). Werden CHO-Zellen unter serumfreien Bedingungen angezogen, so verlieren sie diese Eigenschaft und haften nicht an glatten Trägern, wie etwa Cytodex 3, oder lösen sich leicht von diesen ab, sofern nicht Adhärenzfördernde Zusätze, wie beispielsweise Fibronectin, Insulin oder Transferrin ins Medium gegeben werden. Aufgrund der geringen Adhärenz von CHO-Zellen an Träger unter serumfreien Bedingungen erfolgt die Produktion von rekombinanten Proteinen daher zumeist in Suspensionskultur. Der Produktionsprozess kann dabei in einem kontinuierlichen oder batch-weisen Verfahren ablaufen. Die rekombinante Zellkultur wird dabei bis zu einer optimalen Zelldichte im Bioreaktor angezogen, gegebenenfalls die Proteinexpression induziert und zum Ernten das Medium enthaltend die exprimierten Proteine, jedoch auch rekombinante Zellen in gewissen Abständen dem Reaktionsstank und damit dem Produktionsprozeß entzogen. Durch den ständigen Verlust an Biomasse sinkt die Produktionseffizienz im Bioreaktor ab und erhöht sich erst nach Zugabe von frischem Medium langsam wieder, da die Zellen auf die gewünschte Zelldichte hochwachsen müssen. Es gibt daher, trotz des kontinuierlichen Prozesses, immer wieder eine Verzögerungsphase, in der die Produktionsrate bei diesem System absinkt. Zudem ist die Wachstums- und Produktionskapazität durch die maximal erreichbare Zelldichte in einem solchen System begrenzt.

Bei der Adaptierung von unter serumhaltigen Bedingungen angezüchteten Zellen auf proteinfreies Medium wurde immer wieder festgestellt, daß die Ausbeute an exprimiertem Protein und die Produktivität von rekombinanten CHO-Zellen nach Adaption in proteinfreiem Medium im Vergleich zu serumhaltigen Bedingungen stark absinkt (Paterson et al., 1994, Appl. Microbiol. Biotechnol. 40:691-658).

Dies ist auf eine Instabilität oder reduziertes Wachstum der rekombinanten Klone aufgrund der geänderten Kulturbedingungen zurückzuführen. Aufgrund der veränderten Fermentationsbedingungen wird - trotz Einsetzen eines stabilen Ursprungsklons - immer wieder ein Großteil der Zellen zu Zellen mit verringerter Expression oder auch Nicht-Produzenten, die während des Produktionsprozesses Produkt-Produzenten überwuchern, wodurch die Fermenterkultur letztlich zu einem Großteil aus Nicht-Produzenten bzw. solchen Zellen mit geringer Expression besteht.

Dies hat zur Folge, daß die maximale Produktionskapazität der Fermentationskultur kontinuierlich absinkt und eine maximale Produktproduktion auf eine bestimmte Anzahl von Generationen oder Zellpassagen beschränkt ist.

Es besteht daher ein Bedarf an einem System, bei dem eine kontinuierliche Produktion, insbesondere bei der großtechnischen Herstellung von rekombinanten Proteinen unter serum- und proteinfreien Bedingungen über einen möglichst langen Zeitraum möglich ist.

Es wäre weiterhin wünschenswert, einen rekombinanten Zellklon zu erhalten, der für viele Generationen in der Produktionsphase unter proteinfreien Bedingungen stabil ist und rekombinantes Protein exprimiert.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, ein effizientes Verfahren für die Herstellung von rekombinanten Proteinen unter serum- und proteinfreien Kultivierungs- und Produktionsbedingungen zur Verfügung zu stellen.

Eine weiteres Ziel ist es, einen stabilen rekombinanten Zellklon zur Verfügung zu stellen.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch Zurverfügungstellen eines rekombinanten Zellklons, erhältlich aus einer Zellkultur, die nach Kultivierung eines rekombinanten Ursprungszellklons auf serumhaltigem Medium und Umadaptierung der Zellen auf serum- und proteinfreies Medium erhalten wird. Die Zellen werden

dabei für mindestens 40 Generationen in serum- und proteinfreiem Medium unter produktionsäquivalenten Bedingungen weiterkultiviert.

Der erfindungsgemäße Zellklon bildet daher eine Population von Zellen, die zum überwiegenden Teil für mindestens 40 Generationen stabil im serum- und proteinfreien Medium kultiviert werden kann. Vorzugsweise sind dabei mehr als 80%, insbesondere mehr als 99% der Zellen der erfindungsgemäßen Zellpopulation bzw. des erfindungsgemäßen Zellklons für mindestens 40 Generationen stabil.

Vorzugsweise erfolgt die Kultivierung der Zellen dabei ohne Selektion auf das Selektionsmarker- und/oder Amplifikationsgen, beispielsweise in Abwesenheit MTX bei CHO-dhfr⁻-Zellen.

Unter Ursprungszellklon wird im Rahmen dieser Erfindung ein rekombinanter Zellklon-Transfektant verstanden, der nach Transfektion von Wirtszellen mit einer rekombinanten Nukleotidsequenz unter Laborbedingungen stabil rekombinantes Produkt exprimiert. Der Ursprungsklon wird zur Optimierung des Wachstums in serumhaltigem Medium angezüchtet. Zur Erhöhung der Produktivität wird der Ursprungsklon gegebenenfalls in Gegenwart eines Selektionsmittels und Selektion auf den Selektionsmarker und/oder Amplifikationsmarker angezogen. Für die großtechnische Produktion wird der Ursprungszellklon unter serumhaltigen Kultivierungsbedingungen bis zu einer hohen Zelldichte angezogen und kurz vor der Produktionsphase auf serum- und/oder proteinfreies Medium umadaptiert. Die Kultivierung erfolgt dabei vorzugsweise ohne Selektionsdruck.

Es wurde gefunden, daß unter diesen Bedingungen ein Großteil von mehr als 95% der Zellen in einer solchen auf serum- und proteinfreiem Medium umadaptierten Zellkultur zu Nicht-Produkt-Produzenten werden. Mittels Immunfluoreszenz mit produkt-spezifischen Antikörpern konnte gezeigt werden, daß abhängig von der Generationszeit der Zellen in serum- und proteinfreiem Medium die Anzahl der Nicht-Produzenten in einer Kultur ansteigt und die Produkt-Produzenten überwächst, wodurch die Produktionskapazität

der Kultur absinkt.

Die nach Umadaptierung auf serum- und proteinfreies Medium erhaltene Zellkultur wird auf diejenigen Zellklone der Zellpopulation getestet, die unter serum- und proteinfreien Bedingungen, gegebenenfalls in Abwesenheit eines Selektionsdruckes, stabile Produkte produzieren. Dies kann beispielsweise durch Immunfluoreszenz mit markierten, spezifischen, gegen das rekombinante Polypeptid oder Protein gerichteten Antikörpern erfolgen. Die als Produkt-Produzenten identifizierten Zellen werden aus der Zellkultur isoliert, und unter serum- und proteinfreien, vorzugsweise unter produktionsäquivalenten Bedingungen erneut vermehrt. Die Isolierung der Zellen kann dabei durch Vereinzelung der Zellen und Testen auf Produkt-Produzenten erfolgen. Gegebenenfalls wird die Zellkultur, enthaltend die stabilen Zellen, erneut auf stabile rekombinante Klone getestet und diese aus der Zellkultur isoliert und auskloniert. Anschließend werden die unter serum- und proteinfreien Bedingungen erhaltenen stabilen rekombinanten Zellklone unter serum- und proteinfreien Bedingungen weitervermehrt.

Der erfindungsgemäße rekombinante Zellklon zeichnet sich insbesondere dadurch aus, daß er in serumfreiem und proteinfreiem Medium für mindestens 40, vorzugsweise mindestens 50, insbesondere mehr als 60, Generationen stabil ist und rekombinantes Produkt exprimiert. Dabei zeigen sie diese Stabilität ohne daß sie durch Hilfsmittel wie Matricen oder feste Oberflächen z.B. als Träger unterstützt werden müßten. Auch ist eine Züchtung in hohen Zelldichten erfindungsgemäß nicht erforderlich.

Gemäß einem besonderen Aspekt der Erfindung liegt der stabile rekombinante Zellklon in isolierter Form vor. Ausgehend vom stabilen Zellklon wird unter serum- und proteinfreien Bedingungen eine Zellkultur durch Vermehrung der stabilen Zellen gewonnen.

Der erfindungsgemäße stabile rekombinante Zellklon ist vorzugsweise von einer rekombinanten Säugierzelle abgeleitet. Rekombinante Säugierzellen können dabei alle Zellen sein, die für ein rekombinantes Polypeptid oder Protein kodierende Sequenzen ent-

halten. Umfaßt sind dabei alle kontinuierlich wachsenden Zellen, die sowohl adhärent als auch nicht-adhärent wachsen. Besonders bevorzugt sind rekombinante CHO-Zellen oder BHK-Zellen. Rekombinante Polypeptide oder Proteine können Blutfaktoren, Wachstumsfaktoren oder andere biomedizinisch relevante Produkte sein.

Gemäß der vorliegenden Erfindung sind stabile rekombinante Zellklone bevorzugt, die die kodierende Sequenz für einen rekombinanten Blutfaktor wie Faktor II, Faktor V, Faktor VII, Faktor VIII, Faktor IX, Faktor X, Faktor XI, Protein S, Protein C, eine aktivierte Form eines dieser Faktoren, oder vWF enthalten, und in der Lage sind, diesen stabil über mehrere Generationen zu exprimieren. Besonders bevorzugt sind dabei rekombinante CHO-Zellen, die vWF oder ein Polypeptid mit vWF-Aktivität, Faktor VIII oder ein Polypeptid mit VIII-Aktivität, vWF und Faktor VIII, Faktor IX oder Faktor II exprimieren.

Der unter serum- und proteinfreien Bedingungen selektionierte erfindungsgemäße Zellklon zeichnet sich insbesondere dadurch aus, daß er für mindestens 50, vorzugsweise für mindestens 50 Generationen, besonders bevorzugt für mehr als 60 Generationen, in serum- und proteinfreiem Medium stabil ist.

Um eine Mastzellbank anzulegen, werden 30 Generationen benötigt. Um eine durchschnittliche Batchkultur mit 1000 Liter-Maßstab durchzuführen, sind mindestens etwa 40 Generationen erforderlich. Damit ist es erstmals möglich, ausgehend von einem Einzelklon eine "Master cell bank" (MCB), eine "Working cell bank" (WCB) mit etwa 8 bis 10 Generationen und damit eine Zellkultur im Produktionsmaßstab (Produktionsbiomasse) mit bis zu 20 bis 25 Generationen unter diesen Bedingungen herzustellen, da bisherige Zellklone einige Generationen nach Wachstum auf serum- oder proteinfreiem Medium instabil wurden, wodurch a) keine einheitliche Zellkultur mit Produkt-Produzenten und b) keine stabile Produktproduktivität über einen längeren Zeitraum möglich war.

Der erfindungsgemäße Zellklon ist damit unter Produktionsbedingungen in serum- und proteinfreiem Medium für mindestens 40 Generationen stabil. Bisher beschriebene Verfahren zeigten ledig-

lich eine Generationszahl von weniger als 10 Generationen Produktproduktivität unter proteinfreien Bedingungen (Reiter et al., 1992, supra).

Als Stabilitätskriterium gilt eine Mindestanzahl von mindestens 40 Generationen, vorzugsweise mehr als 50, besonders bevorzugt mehr als 60 Generationen im Produktionsprozeß, während der eine stabile Expression der Proteine stattfindet und sich die Zellen morphologisch-phänotypisch nicht verändern und keine tumorogenen Eigenschaften aufweisen.

Es wurde überraschenderweise gefunden, daß der erfindungsgemäße Zellklon unter serum- und proteinfreien Bedingungen eine erhöhte Produkt-Produktivität selbst im Vergleich zum Ursprungszellklon, der in serumhaltigem Medium kultiviert wurde, aufweist.

Gemäß einem weiteren Aspekt stellt die vorliegende Erfindung eine Zellkultur zur Verfügung, die mindestens 90%, vorzugsweise mehr als 95%, besonders bevorzugt mehr als 98%, stabile rekombinante Zellen enthält, die unter serum- und proteinfreien Bedingungen für mindestens 40 Generationen, insbesondere für mindestens 50 Generationen, stabil sind und rekombinantes Produkt exprimieren.

Unter Zellkultur wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung eine Master Cell Bank (MCB), eine Working Cell Bank (WCB-Arbeitszellbank) oder eine Produktionsbiomasse in einem großtechnischen Produktionsbioreaktor verstanden.

Erfindungsgemäß wird die Zellkultur insbesondere durch Kultivieren eines stabilen rekombinanten Zellklons der oben beschriebenen Art unter serum- und proteinfreien Bedingungen erhalten.

Die erfindungsgemäße Zellkultur ist dabei erhältlich durch Vermehren des isolierten stabilen Zellklons vom Einzelklon, der Saatzellen bis zur der MCB, der WCB oder einer Biomasse im Produktionsmaßstab im Bioreaktor unter serum- und proteinfreien Bedingungen, vorzugsweise ohne Selektionsdruck auf das Selektions- und/oder Markergen. Es hat sich insbesondere gezeigt, daß

die rekombinanten Zellen in einer Zellkultur, die ausgehend vom erfindungsgemäßen stabilen rekombinanten Klon erhalten werden, für mindestens 40 Generationen unter serum- und proteinfreien Bedingungen stabil sind.

Die gemäß der vorliegenden Erfindung zur Verfügung gestellte Zellkultur, die von einem serum- und proteinunabhängigen stabilen Zellklon hergestellt ist, weist unter proteinfreien Kultivierungs- und Produktionsbedingungen mindestens 90%, vorzugsweise mindestens 95%, besonders bevorzugt mindestens 98%, stabile rekombinante Zellen auf. Unter stabilen rekombinanten Zellen werden dabei insbesondere rekombinante Säugerzellen verstanden, die vom stabilen Zellklon abgeleitet sind. Bevorzugt sind dabei rekombinante CHO-Zellen, vorzugsweise CHO-dhfr⁻-Zellen, CHO-K1-Zellen, und BHK-Zellen, die einen Blutfaktor, vorzugsweise rekombinanten vWF, Faktor VIII, Faktor VIII und vWF, Faktor IX oder Faktor II exprimieren.

Die erfindungsgemäße Zellkultur kann die stabilen rekombinanten Zellen als Suspensionskultur enthalten. Die Zellen können auch an einen Träger, insbesondere einen Mikroträger, immobilisiert sein, wobei insbesondere poröse Mikroträger bevorzugt sind. Als besonders geeignet haben sich dabei poröse Träger, wie etwa Cytoline® oder Cytopore®, gezeigt.

Gemäß einem weiteren Aspekt stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur großtechnischen Herstellung eines rekombinanten Produktes unter serum- und proteinfreien Bedingungen, unter Einsatz des erfindungsgemäßen stabilen Zellklons zur Verfügung. Das Verfahren umfaßt dabei die Schritte des Bereitstellens eines isolierten, stabilen rekombinanten Zellklons der oben beschriebenen Art zur Herstellung einer Zellkultur. Dabei erfolgt die Vermehrung des isolierten stabilen Zellklons unter serum- und proteinfreien Bedingungen vom stabilen Einzel-Zellklon bis zur Zellkultur. Insbesondere erfolgt auch die Subkultivierung der stabilen Zellklone unter proteinfreien Bedingungen, insbesondere ohne Zugabe einer Protease, wie etwa Trypsin. Dadurch ist gewährleistet, daß zu keinem Zeitpunkt während der Herstellung einer in der Produktion eines rekombinanten Produktes eingesetz-

ten Zellkultur, eine Kontamination, gegebenenfalls verursacht durch die Zugabe von serum- oder proteinhaltigen Zusätzen humanen oder tierischen Ursprungs zur Zellkultur, erfolgt. Damit wird erstmals ein Verfahren beschrieben, das vom Ausgangsklon über die Herstellung einer Working cell bank bis zur Produktionsbiomasse und die anschließende Produktion von rekombinantem Protein unter serum- und proteinfreien Bedingungen erlaubt.

Die Herstellung der rekombinanten Produkte mit der erfindungsgemäßen Zellkultur, die mehr als 90%, vorzugsweise mehr als 95%, besonders bevorzugt mehr als 98%, stabile Produktproduzenten-Zellen enthält, kann als Suspensionskultur oder mit an Träger-immobilisierten Zellen erfolgen. Der Prozeß kann dabei im batchweisen, kontinuierlichen Verfahren oder durch Perfusionstechnik mit serum- und proteinfreiem Medium erfolgen.

Die exprimierten rekombinanten Proteine werden anschließend aus dem Zellkulturüberstand gewonnen, mit aus dem Stand der Technik bekannten Verfahren gereinigt und weiterverarbeitet.

Als serum- und proteinfreies Medium kann jedes bekannte synthetische Medium eingesetzt werden. Konventionelle synthetische Minimalmedien können anorganische Salze, Aminosäuren, Vitamine und eine Kohlehydratquelle und Wasser enthalten. Beispielsweise kann es DMEM/HAM's F12-Medium sein. Der Gehalt an Soja- oder Hefeextrakt kann zwischen 0,1 und 100 g/l, besonders bevorzugt zwischen 1 und 5 g/l liegen. Als besonders bevorzugte Ausführungsform kann Sojaextrakt, beispielsweise Sojapepton verwendet werden. Das Molekulargewicht des Sojapeptons beträgt weniger als 50kD, bevorzugt weniger als 10kD.

Besonders bevorzugt wird ein Medium mit folgender Zusammensetzung verwendet: Synthetisches Minimalmedium (1 bis 25 g/l), Sojapepton (0,5 bis 50 g/l), L-Glutamin (0,05 bis 1 g/l), NaHCO_3 (0,1 bis 10 g/l), Ascorbinsäure (0,0005 bis 0,05 g/l), Ethanolamin (0,0005 bis 0,05 g/l), Na-Selenit (0,0001 bis 0,01 g/l). Dem Medium kann gegebenenfalls ein nichtionisches Oberflächenmittel wie etwa Polypropylenglycol (PLURONIC F-61, PLURONIC F-68, SYNPERONIC F-68, PLURONIC F-71 oder PLURONIC F108) als

Entschäumer zugegeben werden.

Dieses Mittel wird allgemein angewendet, um die Zellen vor den negativen Auswirkungen der Belüftung zu schützen, da ohne Zugabe eines Oberflächenmittels die aufsteigenden und zerplatzenden Luftblasen zur Schädigung jener Zellen führen können, die sich an der Oberfläche dieser Luftblasen befinden ("sparging"), (Murhammer und Goochee, 1990, Biotechnol.Prog. 6:142-148)

Die Menge an nichtionischem Oberflächenmittel kann dabei zwischen 0,05 und 10 g/l liegen, besonders bevorzugt ist jedoch eine möglichst geringe Menge zwischen 0,1 und 5 g/l. Weiters kann das Medium auch Cyclodextrin oder ein Derivat davon enthalten.

Der Zusatz von nichtionischem Oberflächenmittel oder von Cyclodextrin ist jedoch nicht erfindungswesentlich. Vorzugsweise enthält das serum- und proteinfreie Medium einen Proteaseinhibitor, wie etwa Serinproteaseinhibitoren, die Gewebekultur-tauglich und synthetischen oder pflanzlichen Ursprungs sind.

Die Parameter für die Kultivierung der Zellen, wie O₂-Konzentration, Perfusionsgeschwindigkeit oder Mediumswechsel, pH, Temperatur und Kultivierungstechnik sind dabei abhängig von den jeweils eingesetzten Zelltypen und können vom Fachmann in einfacher Weise ermittelt werden. Beispielsweise kann die Kultivierung von CHO-Zellen in einem Rührtank und Perfusion mit proteinfreiem Medium mit einer Perfusionsrate von 1 bis 10 Volumenwechsel/Tag, einem pH-Wert zwischen 7,0 und 7,8, vorzugsweise bei 7,4, einer O₂-Konzentration zwischen 40% bis 60%, vorzugsweise bei 50%, und einer Temperatur zwischen 34°C und 38°C, vorzugsweise von 37°C, erfolgen.

Gemäß einem weiteren Aspekt stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Gewinnung eines stabilen rekombinanten Zellklons zur Verfügung, umfassend die Schritte der

- Vermehrung eines rekombinanten Ursprungsklons bis zur Zellkultur in serumhaltigem Medium, vorzugsweise ohne

Selektionsdruck

- Kultivierung der Zellen unter serum- und proteinfreien, vorzugsweise unter produktionsäquivalenten Bedingungen
- Testen der Zellkultur unter serum- und proteinfreien Bedingungen auf Produktproduzenten
- Klonieren der stabilen rekombinanten Zellklone unter serum- und proteinfreien Bedingungen, wobei die Klonierung durch allgemein bekannte Techniken, wie Vereinzeln der Zellen durch Ausverdünnen und Anzüchten der Einzelklone erfolgen kann
- Vermehrung der isolierten Zellklone unter serum- und proteinfreien Bedingungen und
- gegebenenfalls Austesten der Zellkultur auf Produktproduzenten.

Dabei werden nur solche rekombinanten Zellklone als stabil angesehen, die für mindestens 10, vorzugsweise mindestens 20, und insbesondere mindestens 50 Generationen, in proteinfreiem Medium stabil rekombinantes Protein exprimieren.

Gemäß einem weiteren Aspekt stellt die Erfindung ein Verfahren zur Gewinnung eines stabilen rekombinanten Zellklons zur Verfügung, umfassend die Schritte

- Vermehren einer nicht-rekombinanten Ausgangszelle oder Zelllinie unter serum- und proteinfreien Bedingungen und Klonieren eines stabilen nicht-rekombinanten Zellklons unter serum- und proteinfreien Bedingungen
- Transfizieren des stabilen Zellklons mit einer rekombinanten Nukleinsäure und Isolieren von stabilen rekombinanten Zellklonen
- Kultivieren der stabilen Zellklon-Transfektanten in serum- und proteinfreiem Medium unter gegebenenfalls produktionsäquivalenten Bedingungen
- Testen der stabilen rekombinanten Zellen auf Produktions- und Produktstabilität.

Die Erfindung wird anhand der nachfolgenden Beispiele beschrieben, wobei sie jedoch nicht auf die Beispiele beschränkt ist.

Kurze Beschreibung der Figuren

Figur 1: zeigt die mikroskopische Aufnahme einer Arbeitszellbank eines Ursprungsklons zum Zeitpunkt der Umadaptierung von serumhaltigem auf serum- und proteinfreies Medium (A), nach 10 Generationen in serum- und proteinfreiem Medium (B) und nach 60 Generationen in serum- und proteinfreiem Medium (C).

Figur 2: zeigt die mikroskopische Aufnahme einer Zellkultur ausgehend von einem stabilen rekombinanten Zellklon unter serum- und proteinfreien Bedingungen auf der Stufe der Arbeitszellbank (A), nach 10 Generationen (B) und nach 60 Generationen (C)

Figur 3: zeigt die Ergebnisse der Kultivierung eines rFVIII-CHO-Zellklons in einem 10 l-Perfusionsbioreaktor.

a) FVIII-Aktivität (mEinheiten/ml) und Perfusionsrate (1-5/Tag) über einen Zeitraum von 42 Tagen.

b) Volumetrische Produktivität (Einheiten Faktor VIII/l/Tag) im Perfusionsbioreaktor.

B e i s p i e l e :

B e i s p i e l 1 : Stabilität von rvWF-CHO-Zellen nach Umstellen von serumhaltigem auf serum- und proteinfreies Medium

CHO-dhfr⁻-Zellen wurden Plasmid phAct-rvWF und pSV-dhfr, co-transfiziert und vWF-exprimierende Klone, wie in Fischer et al. (1994, FEBS Letters 351:345-348) beschrieben, subkloniert. Von den Subklonen, die stabil rvWF exprimierten, wurde unter serumhaltigen Bedingungen, jedoch in Abwesenheit von MTX, eine Arbeitszellbank (Working cell bank, WCB) angelegt und die Zellen unter serumhaltigen Bedingungen auf einem porösen Mikroträger (Cytopore®) immobilisiert. Nachdem eine Zelldichte von 2×10^7 Zellen/ml Trägermatrix erreicht wurde, erfolgte die Umstellung der Zellen auf serum- und proteinfreies Medium. Die Zellen wurden für mehrere Generationen unter serum- und proteinfreien Bedingungen weiterkultiviert. Mittels Immunfluoreszenz mit markierten anti-vWF-Antikörpern wurden die Zellen zu verschiedenen

Zeitpunkten in serum- und proteinfreiem Medium getestet. Die Bewertung der Stabilität der Zellen erfolgte bei der Arbeitszellbank vor der Mediumsumstellung, nach 10 und 60 Generationen im serum- und proteinfreiem Medium. Während die Arbeitszellbank noch 100% rvWF-Produzenten aufwies (Figur 1 A), sank der Anteil der rvWF-Produzenten nach 10 Generationen in serum- und proteinfreiem Medium auf etwa 50% ab (Figur 1 B). Nach 60 Generationen wurden mehr als 95% der Zellen als Nicht-Produzenten identifiziert (Figur 1 C).

B e i s p i e l 2 : Klonierung von stabilen rekombinanten CHO-Klonen

Von der Zellkultur enthaltend rvWF-CHO-Zellen gemäß Beispiel 1, die für 60 Generationen in serum- und proteinfreiem Medium kultiviert worden war (Figur 1 C), wurde eine Verdünnung angelegt und jeweils 0,1 Zellen/well einer Mikrotiterplatte ausgesät. Die Zellen wurden in DMEM/HAM's F12 ohne Serum- oder Proteinzusätze und ohne Selektionsdruck für etwa 3 Wochen kultiviert und die Zellen mit Immunfluoreszenz mit markierten anti-vWF-Antikörpern getestet. Ein als positiv identifizierter Zellklon wurde als Ausgangsklon für die Herstellung einer Saat-Zellbank eingesetzt. Von der Saat-Zellbank wurde eine Master-Zellbank (MCB) in serum- und proteinfreiem Medium angelegt und Einzelampullen für die weitere Herstellung einer Arbeitszellbank weggefroren. Ausgehend von einer Einzelampulle wurde eine Arbeitszellbank in serum- und proteinfreiem Medium hergestellt. Die Zellen wurden auf poröse Mikroträger immobilisiert und für mehrere Generationen unter serum- und proteinfreien Bedingungen weiterkultiviert. Mittels Immunfluoreszenz mit markierten anti-vWF-Antikörpern wurden die Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten in serum- und proteinfreiem Medium auf Produktivität getestet. Die Bewertung der Stabilität der Zellen erfolgte auf der Stufe der Arbeitszellbank und nach 10 und 60 Generationen im serum- und proteinfreiem Medium. Sowohl auf Stufe der Arbeitszellbank (Figur 2 A), als auch nach 10 (Figur 2 B) und 60 Generationen (Figur 2 C) wurden annähernd 100% der Zellen als positive stabile rekombinante Klone identifiziert, die rvWF exprimieren.

B e i s p i e l 3 : Zellspezifische Produktivität der rekombinanten Zellklone

Von der definierten Stufe während der Kultivierung von rekombinanten Zellen wurde eine definierte Zellzahl entnommen und mit frischem Medium für 24 h inkubiert. Die rvWF:Risto-CoF-Aktivität wurde in den Zellkulturüberständen bestimmt. Tabelle 1 zeigt, daß die zellspezifische Produktivität bei den erfindungsgemäßen stabilen rekombinanten Zellklonen auch nach 60 Generationen in serum- und proteinfreiem Medium stabil war, und sogar im Vergleich zum Ursprungsklon, der in serumhaltigem Medium kultiviert war, erhöht war.

T a b e l l e 1:

zellklon	zellspezifische Produktivität der Arbeitszellen mU rvWF/10 ⁶ zellen/Tag	zellspezifische Produktivität nach 10 Generationen mU rvWF/10 ⁶ zellen/Tag	zellspezifische Produktivität nach 60 Generationen mU rvWF/10 ⁶ zellen/Tag
rvWF-CHO #808.68			
Ursprungszellklon	55	30	< 10
I-rvWF-CHO F7 *)			
stabiler Klone	62	65	60

*) hinterlegt gemäß Budapest Vertrag am 22.1.1998 (ECACC (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, Wiltshire SP4 OJG, UK); Hinterlegungsnummer 98012206)

B e i s p i e l 4 : Kultivierung von rFVIII-CHO Zellen in protein- und serumfreiem Minimalmedium

Eine Zellkultur enthaltend rFVIII-CHO-Zellen wurde in einem 10 l-Rührtank und Perfusion kultiviert. Dabei wurde ein serum- und proteinfreies Medium verwendet. Die Zellen wurden dabei auf einem porösen Mikroträger (Cytopore®, Pharmacia) immobilisiert und für mindestens 6 Wochen kultiviert. Die Perfusionsrate betrug 4 Volumenwechsel/Tag, der pH-Wert lag bei 6,9-7,2, die O₂-Konzentration bei etwa 20-50% und die Temperatur bei 37°C.

Figur 3 zeigt die Ergebnisse der Kultivierung eines rFVIII-CHO-Zellklons in einem 10 l-Perfusionsbioreaktor.

a) FVIII-Aktivität (mEinheiten/ml) und Perfusionsrate (1-5/Tag) über einen Zeitraum von 42 Tagen.

b) Volumetrische Produktivität (Einheiten Faktor VIII/l/Tag) im Perfusionsbioreaktor.

T a b e l l e 2:

Kultivierungstage	Zellspezifische Produktivität (mU/10 ⁶ Zellen/Tag)	Immunfluoreszenz (% FVIII-positive Zellen)
15	702	n.a.
21	1125	n.a.
28	951	> 95%
35	691	> 95%
42	970	n.a.

Tabelle 2 zeigt die Stabilität und spezifische Produktivität der rFVIII-exprimierenden Zellen. Für diese Ergebnisse wurden nach 15, 21, 28, 35 und 42 Tagen Proben entnommen, bei 300 g abzentrifugiert und in frischem serum- und proteinfreiem Medium resuspendiert. Nach weiteren 24 Stunden wurde die Faktor VIII-Konzentration in den Zellkulturüberständen und die Zellzahl bestimmt. Ausgehend von diesen Daten wurde die spezifische FVIII-Produktivität berechnet.

Es wurde eine stabile durchschnittliche Produktivität von 888 mEinheiten/ 10^6 -Zellen/Tag erreicht. Diese stabile Produktivität wurde auch durch Immunfluoreszenz mit markierten anti-FVIII-Antikörpern nach 15, 21, 28, 35 und 42 Tagen in serum- und proteinfreiem Medium bestätigt.

P a t e n t a n s p r ü c h e :

1. Rekombinanter Zellklon, dadurch gekennzeichnet, daß er in serum- und proteinfreiem Medium für mindestens 40, vorzugsweise mindestens 50, Generationen stabil ist und rekombinantes Produkt exprimiert.
2. Zellklon nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß er in isolierter Form vorliegt.
3. Zellklon nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß er von einer rekombinanten Säugierzelle abgeleitet ist.
4. Zellklon nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Säugierzelle eine rekombinante CHO-Zelle oder BHK-Zelle ist.
5. Zellklon nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß er die für ein rekombinantes Polypeptid oder Protein kodierenden Sequenzen enthält.
6. Zellklon nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß das rekombinante Protein ein Blutfaktor, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Faktor II, Faktor V, Faktor VII, Faktor VIII, Faktor IX, Faktor X, Faktor XI, Protein S, Protein C oder einer aktivierten Form eines der Faktoren, oder vWF ist.
7. Zellklon nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Zelle eine rekombinante CHO-Zelle ist, die von Willebrand-Faktor exprimiert.
8. Zellklon nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Zelle eine rekombinante CHO-Zelle ist, die Faktor VIII exprimiert.
9. Zellklon nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Zelle eine rekombinante CHO-Zelle ist, die Faktor VIII und vWF co-exprimiert.

10. Zellklon nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, das die Zelle eine rekombinante CHO-Zelle ist, die Faktor IX exprimiert.
11. Zellklon nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, das die Zelle eine rekombinante CHO-Zelle ist, die Faktor II exprimiert.
12. Rekombinanter Zellklon nach einem der Ansprüche 1 bis 11, erhältlich aus einer Zellkultur, die nach Kultivierung eines rekombinanten Ursprungszellklons auf serumhaltigem Medium und Umadaptierung der Zellen auf serum- und proteinfreies Medium erhalten wird, Testen der Zellkultur auf stabile Produkt-Produzenten und Klonieren eines stabilen Produkt-Produzenten-Zellklons unter serum- und proteinfreien Bedingungen.
13. Zellkultur, dadurch gekennzeichnet, daß sie mindestens 90%, vorzugsweise mehr als 95% stabile rekombinante Zellen enthält, die unter serum- und proteinfreien Bedingungen für mehr als 50 Generationen stabil sind und rekombinantes Produkt exprimieren.
14. Zellkultur nach Anspruch 13 erhältlich durch Kultivieren eines stabilen rekombinanten Zellklons nach einem der Ansprüche 1 bis 12.
15. Zellkultur nach einem der Ansprüche 13 oder 14 erhältlich durch die Schritte
 - Vermehren eines rekombinanten Ursprungsklons in serumhaltigem Medium,
 - Kultivierung der Zellen unter serum- und proteinfreien Bedingungen bis zur Zellkultur,
 - Testen der Zellkultur unter serum- und proteinfreien Bedingungen auf Produktproduzenten,
 - Klonieren von stabilen Zellklonen unter serum- und proteinfreien Bedingungen,
 - Vermehrung stabiler Zellklone unter serum- und proteinfreien Bedingungen,
16. Zellkultur nach einem der Ansprüche 13 bis 15, dadurch ge-

kennzeichnet, daß die stabilen rekombinanten Zellen Säugerzellen sind.

17. Zellkultur nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Säuger-Zellen rekombinante CHO-Zellen, vorzugsweise CHO-DHFR⁻-Zellen, CHO-K1-Zellen oder BHK-Zellen sind.

18. Zellkultur nach einem der Ansprüche 13 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß die stabilen Zellen eine für ein rekombinantes Polypeptid oder Protein kodierende Sequenz enthalten.

19. Zellkultur nach einem der Ansprüche 13 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen an einem Mikroträger immobilisiert sind.

20. Verfahren zur großtechnischen Herstellung eines rekombinanten Produktes unter serum- und proteinfreien Bedingungen umfassend die Schritte

- Bereitstellen eines isolierten, stabilen rekombinanten Zellklons nach einem der Ansprüche 1 bis 12,
- Vermehrung des stabilen Zellklons in serum- und proteinfreiem Medium vom Ausgangsklon bis zur Zellkultur,
- Herstellung der Zellkultur enthaltend stabile Zellen im Bioreaktor, und
- Ernten der Proteine aus dem Kulturüberstand.

21. Verfahren nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß das serum- und proteinfreie Medium ein synthetisches Minimalmedium enthaltend ein Hefe- oder Sojaextrakt ist.

22. Verfahren nach Anspruch 20 oder 21, dadurch gekennzeichnet, daß das serum- und proteinfreie Medium einen Proteaseinhibitor enthält.

23. Verfahren zur Gewinnung eines stabilen rekombinanten Zellklons umfassend die Schritte

- Vermehren eines rekombinanten Ursprungsklon bis zur Zellkultur in serumhaltigem Medium,
- Kultivierung der Zellen unter serum- und proteinfreien produktionsäquivalenten Bedingungen,
- Testen der Zellkultur unter serum- und proteinfreien Bedingungen auf Produktproduzenten,
- Klonieren der unter serum- und proteinfreien Bedingungen stabilen rekombinanten Zellklone und
- Vermehrung der stabilen Zellklone unter serum- und proteinfreien Bedingungen.

24. Verfahren zur Gewinnung eines stabilen rekombinanten Zellklons umfassend die Schritte

- Vermehren einer nicht-rekombinanten Ausgangszelle unter serum- und proteinfreien Bedingungen,
- Klonieren eines stabilen nicht-rekombinanten Zellklons unter serum- und proteinfreien Bedingungen,
- Transfizieren des stabilen Zellklons mit einer rekombinanten Nukleinsäure und Isolieren von stabilen Transfektanten,
- Kultivieren der Transfektanten in serum- und proteinfreiem Medium unter produktionsäquivalenten Bedingungen und
- Testen der Zellen auf Produktionsstabilität.

25. Serum- und proteinfreies synthetisches Medium bestehend aus Minimalmedium, Sojapepton, Glutamin, Natriumhydrogencarbonat, Ascorbinsäure, Ethanolamin und Natrium-Selenit.

26. Medium nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß das Minimalmedium anorganische Salze, Aminosäuren, Vitamine und eine Kohlenhydratquelle enthält.

27. Zellkultur in einem serum- und proteinfreien Medium nach Anspruch 25 oder 26.

28. Verfahren zur Herstellung eines rekombinanten Polypeptids in einer Zellkultur, dadurch gekennzeichnet, daß es folgende Schritte umfaßt:

- Vermehren eines stabilen Zellklons in serum- und protein-freiem Medium vom Ausgangsklon bis zur Zellkultur.
- Herstellen der Zellkultur enthaltend stabile Zellen im Bioreaktor und
- Ernten der Proteine aus dem Kulturüberstand.

29. Verfahren nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, daß das rekombinante Polypeptid ein Blutfaktor, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Faktor II, Faktor V, Faktor VII, Faktor VIII, Faktor IX, Faktor X, Faktor XI, Protein S, Protein C oder Polypeptid mit deren Aktivität oder einer aktivierten Form eines der Faktoren oder vWF ist.

30. Verfahren nach Anspruch 28 oder 29, dadurch gekennzeichnet, daß die Zelle eine rekombinante CHO-Zelle ist, die von Willebrand-Faktor oder ein Polypeptid mit vWF-Aktivität exprimiert.

31. Verfahren nach Anspruch 28 oder 29, dadurch gekennzeichnet, daß die Zelle eine rekombinante CHO-Zelle ist, die Faktor VIII oder ein Polypeptid mit Faktor VIII-Aktivität exprimiert.

32. Verfahren nach Anspruch 28 oder 29, dadurch gekennzeichnet, daß die Zelle eine rekombinante CHO-Zelle ist, die Faktor VIII und vWF co-exprimiert.

33. Verfahren nach Anspruch 28 oder 29, dadurch gekennzeichnet, daß die Zelle eine rekombinante CHO-Zelle ist, die Faktor IX exprimiert.

34. Verfahren nach Anspruch 28 oder 29, dadurch gekennzeichnet, daß die Zelle eine rekombinante CHO-Zelle ist, die Faktor II exprimiert.

Fig. 1

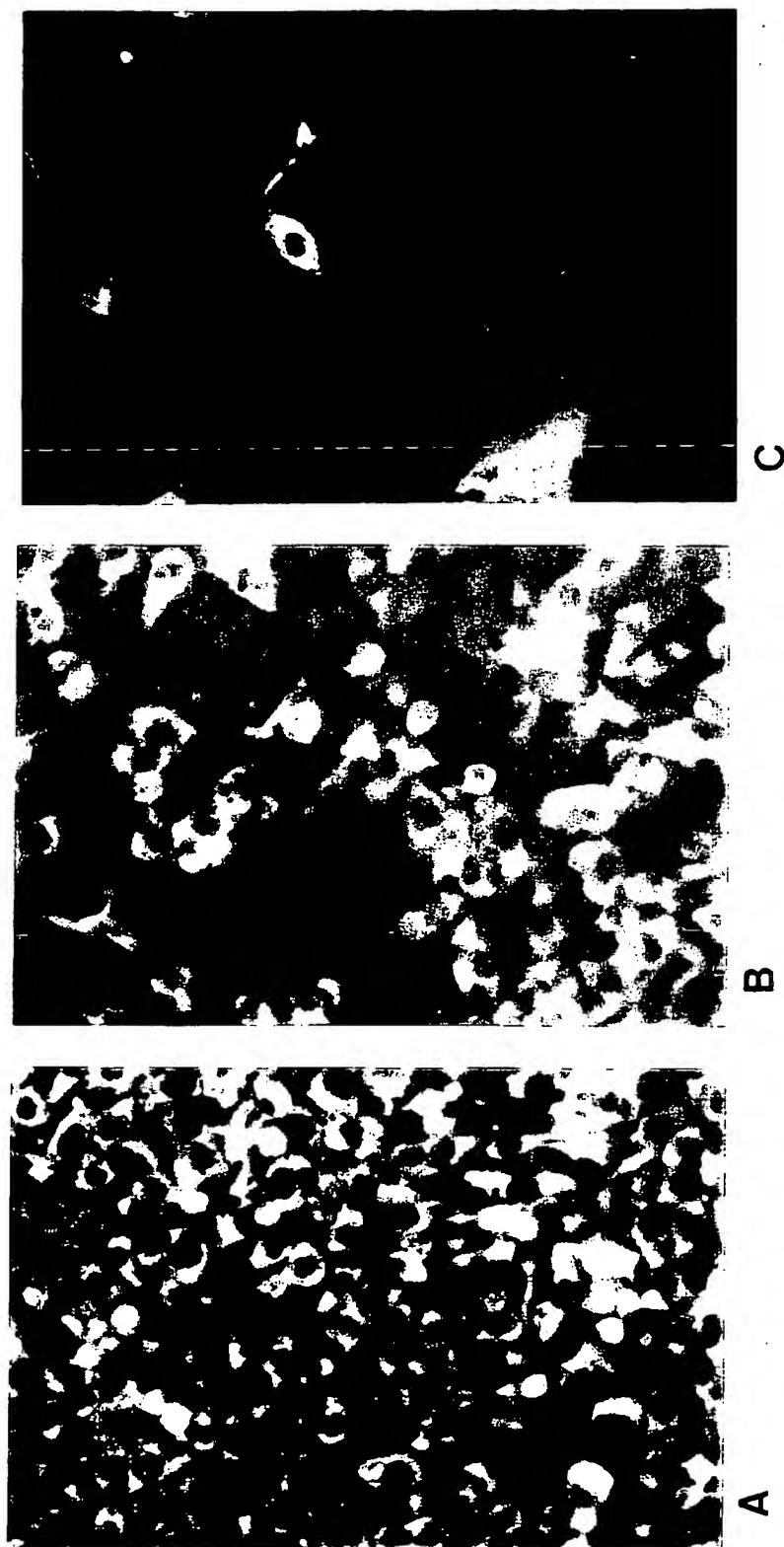
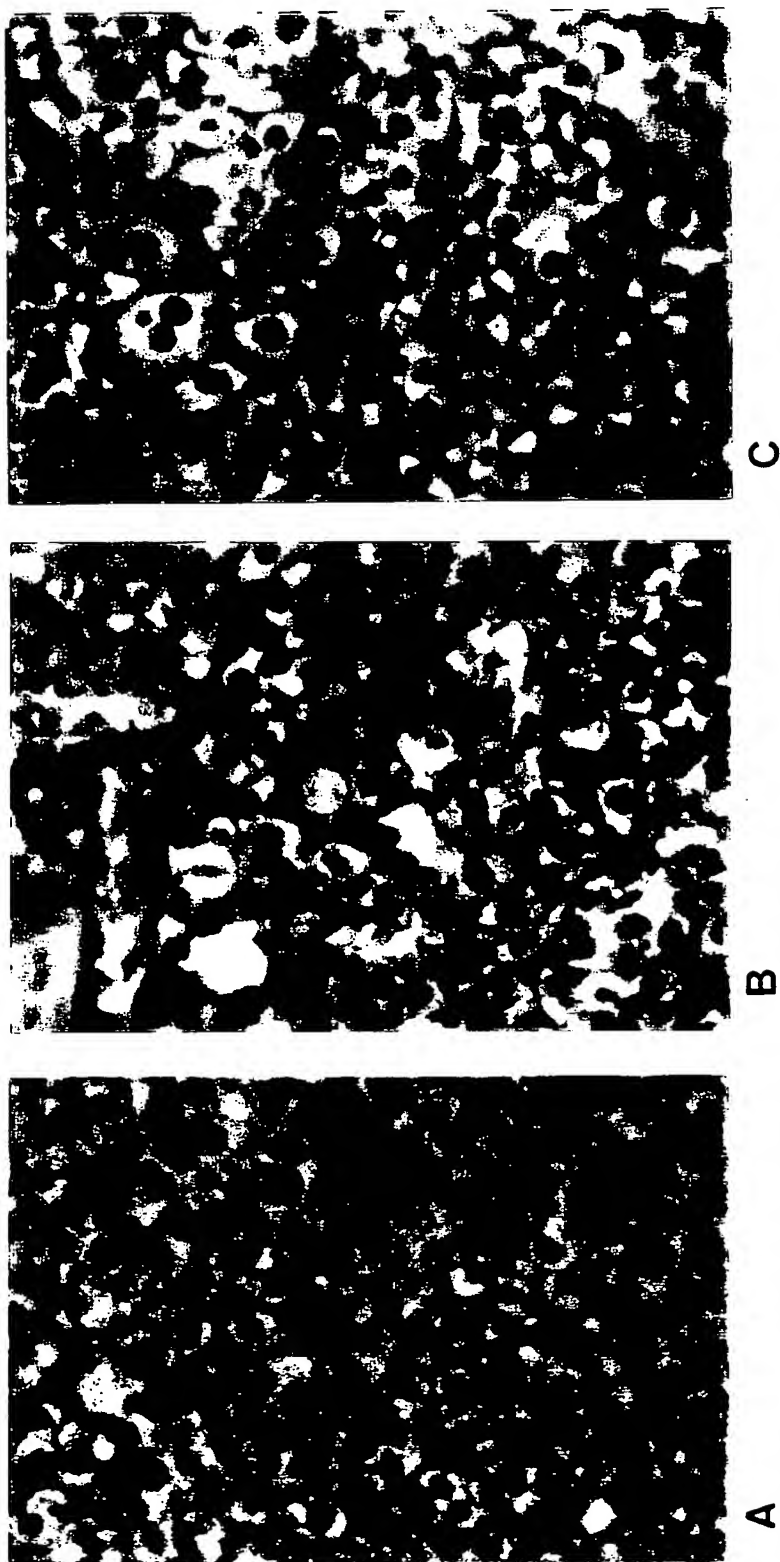


Fig. 2



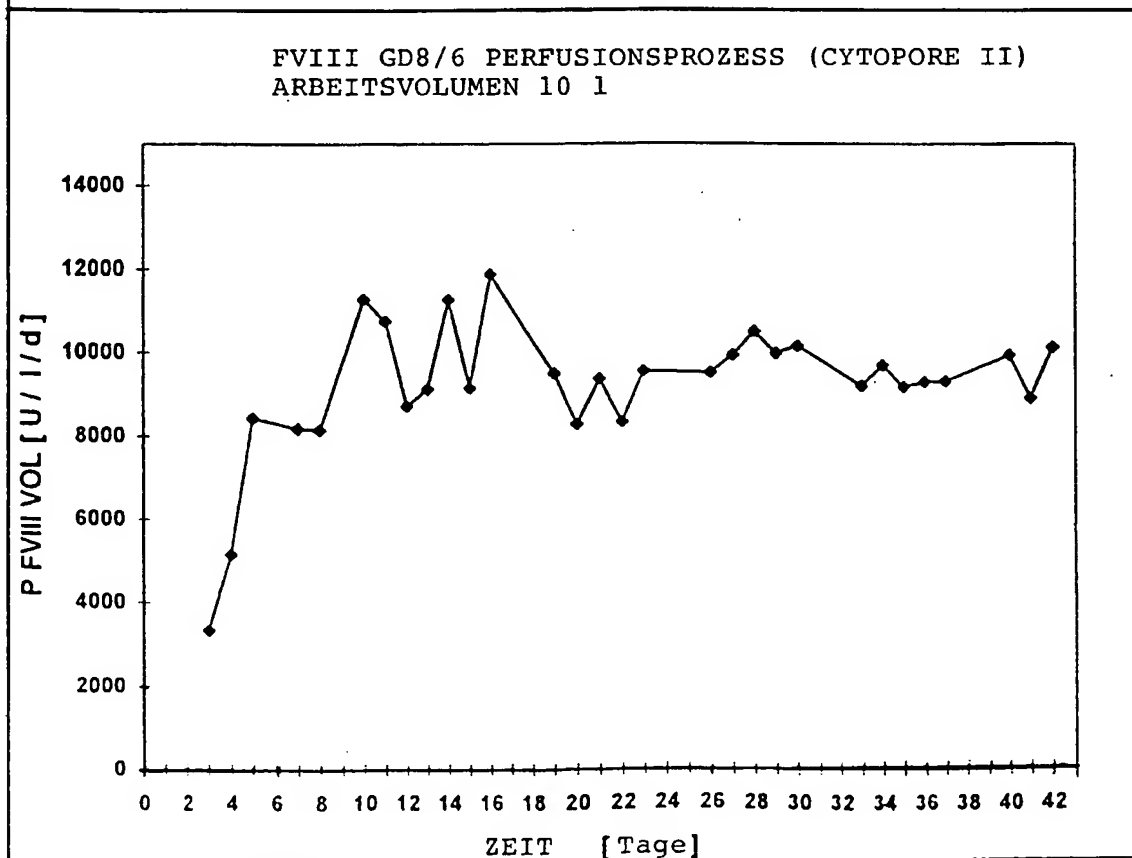
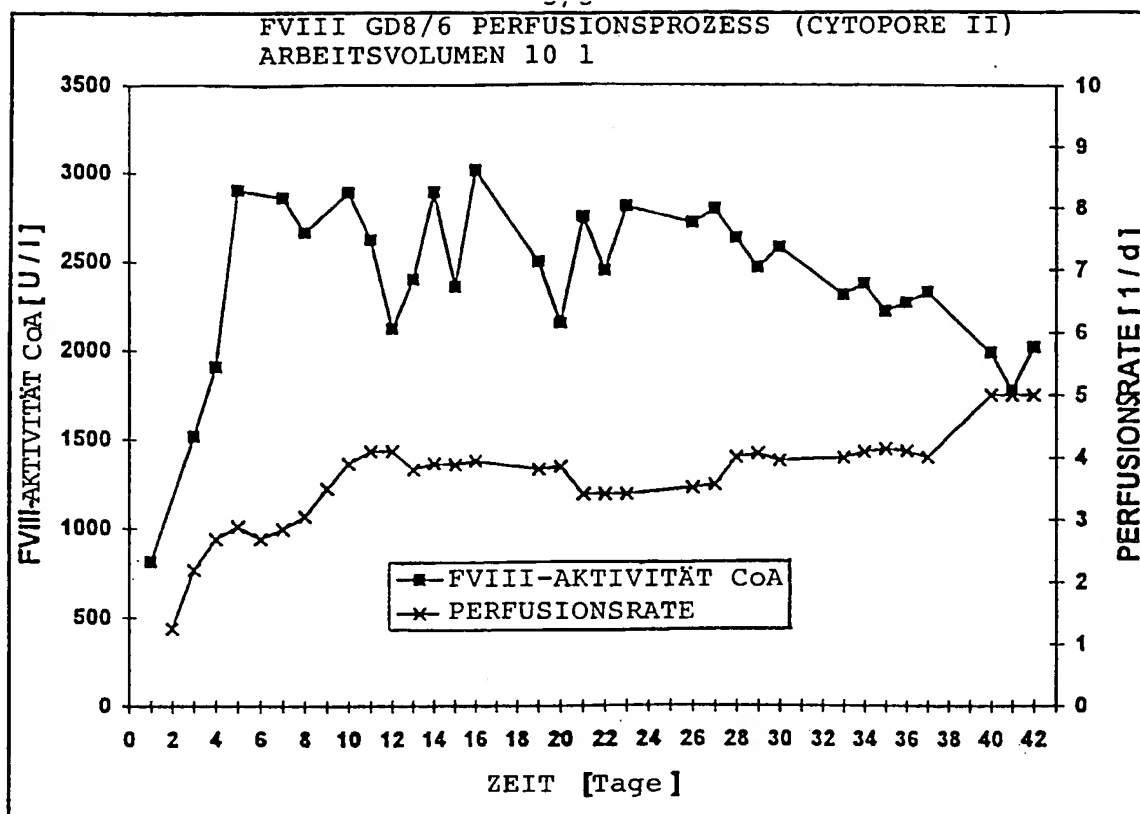


FIG. 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. nal Application No

PCT/AT 99/00197

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N5/10 C12P21/02 C12N9/64 C07K14/745

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, SCISEARCH, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97 05240 A (GRAY PETER PHILIP ;UNISEARCH LTD (AU); COMMW SCIENT IND RES ORG (A) 13 February 1997 (1997-02-13) cited in the application page 1, line 4 - line 10 page 5, line 1 - line 3 page 8, line 30 -page 9, line 4 page 21, line 6 - line 16 page 23, line 19 -page 24, line 14 claims 1,7,13,18,25-29,42,43 ---	1-5, 12-20, 23,28
X	EP 0 666 312 A (RENNER WOLFGANG A ;BAILEY JAMES E (CH); EPPENBERGER HANS M (CH)) 9 August 1995 (1995-08-09) the whole document --- -/--	1-5, 12-18,23

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 June 2000

Date of mailing of the international search report

12/07/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Stein, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/AT 99/00197

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ZANG M ET AL: "PRODUCTION OF RECOMBINANT PROTEINS IN CHINESE HAMSTER OVARY CELLS USING A PROTEIN-FREE CELL CULTURE MEDIUM" BIO/TECHNOLOGY,US,NATURE PUBLISHING CO. NEW YORK, vol. 13, 1 April 1995 (1995-04-01), pages 389-392, XP002032677 ISSN: 0733-222X the whole document	1-5, 12-18, 20,23,28
X	WO 96 18734 A (CIBA GEIGY AG ;OOSTRUM JAN VAN (CH); ASSELBERGS FREDERICUS ALPHONS) 20 June 1996 (1996-06-20) page 15. line 16 -page 16. line 2 page 18. line 5 -page 19. line 14 claims 1.3,11	1-5, 12-18, 20,23, 24,28
X	US 5 633 162 A (KEEN MICHAEL J ET AL) 27 May 1997 (1997-05-27)	25-27
A	the whole document in particular Table 1, column 6 line 33 - line 38 , claim 17	20,21
X	HARANT H ET AL: "Two-dimensional electrophoresis as a tool for control of quality and consistency in production systems using animal cells" CYTOTECHNOLOGY, vol. 6, 1992, pages 119-127, XP002140916 the whole document	1-5
X	KATINGER. H. ET AL: "Long-term stability of continuously perfused animal cells immobilized on novel macroporous microcarriers" ADV. MOL. CELL BIOL. (1996), 15A(BIOCHEMICAL TECHNOLOGY), 193-207 , XP000914905	1-5,13, 14, 18-20,28
Y	the whole document	6-11, 29-34
Y	FISCHER. BERNHARD ET AL: "Comparison of N-glycan pattern of recombinant human coagulation factors II and IX expressed in chinese hamster ovary (CHO) and African green monkey (Vero) cells" J. THROMB. THROMBOLYSIS (1996), 3(1), 57-62 , XP000914907 the whole document	6,10,11, 29,33,34

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/AT 99/00197

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	FISCHER B ET AL: "Structural analysis of recombinant von Willebrand factor: identification of hetero- and homo-dimers" FEBS LETTERS, vol. 351, 1994, pages 345-348, XP002140917 cited in the application the whole document ----	6,7,29, 30
Y	KAUFMAN RJ ET AL: "Effect of von Willebrand Factor coexpression on the synthesis and secretion of Factor VIII in Chinese Hamster Ovary Cells" MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, vol. 9, no. 3, 1989, pages 1233-1242, XP002140918 the whole document ----	6-9, 29-32
A	US 5 851 800 A (LIE KRISTINA LIMA ET AL) 22 December 1998 (1998-12-22) column 3, line 60 -column 4, line 29 column 6, line 51 -column 9, line 12 claims 1,11-19 ----	22
A	WO 96 15231 A (IMMUNO AG ;BARRETT NOEL (AT); KISTNER OTFRIED (AT); MUNDT WOLFGANG) 23 May 1996 (1996-05-23) cited in the application page 23, line 31 -page 27, line 27 page 33, line 4 - line 28 claims 41-44 -----	24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/AT 99/00197

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9705240 A	13-02-1997	AU 704095 B AU 6510196 A CA 2227789 A EP 0843722 A JP 11509734 T	15-04-1999 26-02-1997 13-02-1997 27-05-1998 31-08-1999
EP 0666312 A	09-08-1995	US 5811299 A	22-09-1998
WO 9618734 A	20-06-1996	AU 4302796 A EP 0799310 A JP 10511082 T	03-07-1996 08-10-1997 27-10-1998
US 5633162 A	27-05-1997	US 5316938 A AU 645615 B AU 8591591 A CA 2053586 A EP 0481791 A JP 2625302 B JP 6070757 A NZ 240248 A ZA 9108249 A	31-05-1994 20-01-1994 07-05-1992 18-04-1992 22-04-1992 02-07-1997 15-03-1994 25-11-1994 16-04-1993
US 5851800 A	22-12-1998	AU 716245 B AU 2919797 A EP 0934424 A NO 985297 A WO 9743436 A	24-02-2000 05-12-1997 11-08-1999 14-01-1999 20-11-1997
WO 9615231 A	23-05-1996	US 5753489 A US 5756341 A CA 2205015 A EP 0791055 A FI 971998 A JP 10503093 T US 5698433 A	19-05-1998 26-05-1998 23-05-1996 27-08-1997 09-05-1997 24-03-1998 16-12-1997

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationale Aktenzeichen

PCT/AT 99/00197

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 C12N5/10 C12P21/02 C12N9/64 C07K14/745		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE		
Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 C12N		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, SCISEARCH, CHEM ABS Data		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 97 05240 A (GRAY PETER PHILIP ;UNISEARCH LTD (AU); COMMW SCIENT IND RES ORG (A) 13. Februar 1997 (1997-02-13) in der Anmeldung erwähnt Seite 1, Zeile 4 - Zeile 10 Seite 5, Zeile 1 - Zeile 3 Seite 8, Zeile 30 -Seite 9, Zeile 4 Seite 21, Zeile 6 - Zeile 16 Seite 23, Zeile 19 -Seite 24, Zeile 14 Ansprüche 1,7,13,18,25-29,42,43 ---	1-5, 12-20, 23,28
X	EP 0 666 312 A (RENNER WOLFGANG A ;BAILEY JAMES E (CH); EPPENBERGER HANS M (CH)) 9. August 1995 (1995-08-09) das ganze Dokument ---	1-5, 12-18,23
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts
23. Juni 2000		12/07/2000
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Stein, A

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/AT 99/00197

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	ZANG M ET AL: "PRODUCTION OF RECOMBINANT PROTEINS IN CHINESE HAMSTER OVARY CELLS USING A PROTEIN-FREE CELL CULTURE MEDIUM" BIO/TECHNOLOGY,US,NATURE PUBLISHING CO. NEW YORK, Bd. 13, 1. April 1995 (1995-04-01), Seiten 389-392, XP002032677 ISSN: 0733-222X das ganze Dokument	1-5, 12-18, 20,23,28
X	WO 96 18734 A (CIBA GEIGY AG ;OOSTRUM JAN VAN (CH); ASSELBERGS FREDERICUS ALPHONS) 20. Juni 1996 (1996-06-20) Seite 15, Zeile 16 -Seite 16, Zeile 2 Seite 18, Zeile 5 -Seite 19, Zeile 14 Ansprüche 1,3,11	1-5, 12-18, 20,23, 24,28
X	US 5 633 162 A (KEEN MICHAEL J ET AL) 27. Mai 1997 (1997-05-27)	25-27
A	das ganze Dokument insbesondere Tabelle 1, Spalte 6 Zeile 33 - Zeile 38, Anspruch 17	20,21
X	HARANT H ET AL: "Two-dimensional electrophoresis as a tool for control of quality and consistency in production systems using animal cells" CYTOTECHNOLOGY, Bd. 6, 1992, Seiten 119-127, XP002140916 das ganze Dokument	1-5
X	KATINGER, H. ET AL: "Long-term stability of continuously perfused animal cells immobilized on novel macroporous microcarriers" ADV. MOL. CELL BIOL. (1996), 15A(BIOCHEMICAL TECHNOLOGY), 193-207 , XP000914905	1-5,13, 14, 18-20,28
Y	das ganze Dokument	6-11, 29-34
Y	FISCHER, BERNHARD ET AL: "Comparison of N-glycan pattern of recombinant human coagulation factors II and IX expressed in chinese hamster ovary (CHO) and African green monkey (Vero) cells" J. THROMB. THROMBOLYSIS (1996), 3(1), 57-62 , XP000914907 das ganze Dokument	6,10,11, 29,33,34

-/--

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/AT 99/00197

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	FISCHER B ET AL: "Structural analysis of recombinant von Willebrand factor: identification of hetero- and homo-dimers" FEBS LETTERS, Bd. 351, 1994, Seiten 345-348, XP002140917 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---	6,7,29, 30
Y	KAUFMAN RJ ET AL: "Effect of von Willebrand Factor coexpression on the synthesis and secretion of Factor VIII in Chinese Hamster Ovary Cells" MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, Bd. 9, Nr. 3, 1989, Seiten 1233-1242, XP002140918 das ganze Dokument ---	6-9, 29-32
A	US 5 851 800 A (LIE KRISTINA LIMA ET AL) 22. Dezember 1998 (1998-12-22) Spalte 3, Zeile 60 -Spalte 4, Zeile 29 Spalte 6, Zeile 51 -Spalte 9, Zeile 12 Ansprüche 1,11-19 ---	22
A	WO 96 15231 A (IMMUNO AG ;BARRETT NOEL (AT); KISTNER OTFRIED (AT); MUNDT WOLFGANG) 23. Mai 1996 (1996-05-23) in der Anmeldung erwähnt Seite 23, Zeile 31 -Seite 27, Zeile 27 Seite 33, Zeile 4 - Zeile 28 Ansprüche 41-44 -----	24

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen
PCT/AT 99/00197

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9705240 A	13-02-1997	AU 704095 B	15-04-1999
		AU 6510196 A	26-02-1997
		CA 2227789 A	13-02-1997
		EP 0843722 A	27-05-1998
		JP 11509734 T	31-08-1999
EP 0666312 A	09-08-1995	US 5811299 A	22-09-1998
WO 9618734 A	20-06-1996	AU 4302796 A	03-07-1996
		EP 0799310 A	08-10-1997
		JP 10511082 T	27-10-1998
US 5633162 A	27-05-1997	US 5316938 A	31-05-1994
		AU 645615 B	20-01-1994
		AU 8591591 A	07-05-1992
		CA 2053586 A	18-04-1992
		EP 0481791 A	22-04-1992
		JP 2625302 B	02-07-1997
		JP 6070757 A	15-03-1994
		NZ 240248 A	25-11-1994
		ZA 9108249 A	16-04-1993
US 5851800 A	22-12-1998	AU 716245 B	24-02-2000
		AU 2919797 A	05-12-1997
		EP 0934424 A	11-08-1999
		NO 985297 A	14-01-1999
		WO 9743436 A	20-11-1997
WO 9615231 A	23-05-1996	US 5753489 A	19-05-1998
		US 5756341 A	26-05-1998
		CA 2205015 A	23-05-1996
		EP 0791055 A	27-08-1997
		FI 971998 A	09-05-1997
		JP 10503093 T	24-03-1998
		US 5698433 A	16-12-1997